

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA DIVERSIFICATION DES CELLULES GLIALES ENTÉRIQUES DANS UN
CONTEXTE PHYSIOLOGIQUE ET DANS UN MODÈLE MURIN DU SYNDROME DE
WAARDENBURG DE TYPE IV

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU PROGRAMME DE BIOCHIMIE

PAR
MARIE LEFÈVRE

JANVIER 2026

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.12-2023). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Pour commencer, je souhaite remercier les Professeurs Nicolas Pilon et Rodolphe Soret qui ont été mes codirecteurs de thèse pendant ces 6 dernières années. Nicolas, merci du fond du cœur de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné cette opportunité inespérée. Tu m'as permis d'évoluer dans un environnement scientifique particulièrement stimulant intellectuellement, avec des capacités matérielles exceptionnelles pour avoir la liberté d'expérimenter dans d'excellentes conditions. Rodolphe, il est certain que je n'aurais pu aller au bout de ce cheminement sans ton soutien. Pour moi, tu as été un mentor qui m'a apporté énormément sur le plan autant scientifique que personnel. À vous deux, merci d'avoir su vous adapter à mes limitations et de me pousser quand cela était nécessaire. Merci également de m'avoir donné la possibilité de participer à d'excellents congrès scientifiques, de publier dans des journaux de qualité et d'avoir prodigué un encadrement scientifique aussi exceptionnel que vos expertises scientifiques respectives.

Je remercie très chaleureusement les membres de mon jury, les professeurs Claire Bénard, Christophe Faure et Marc Lussier, d'avoir pris le temps de m'évaluer malgré vos emplois du temps particulièrement occupés.

À tous les membres actuels et passés du laboratoire Pilon, merci d'avoir créé un environnement de travail exceptionnellement joyeux, stimulant et présent quand la thèse était plus difficile. J'aimerais remercier particulièrement Grégoire Bonnamour, Tatiana Cardinal, Élizabeth Leduc, Séphora Sallis et Baptiste Charrier. Sans votre gentillesse, vos conseils, votre soutien moral, et votre amitié, jamais je n'aurais pu aller au bout de cette thèse. Merci de votre patience envers mes excentricités, mes inquiétudes pour l'avenir et mes angoisses existentielles ; et désolée d'avoir été pénible par moments. Je vous souhaite tout le meilleur pour la suite. Évidemment, je remercie également Alassane Gary et Nejia Lassoued, mes compères de l'équipe Hirschsprung avec qui nous avons vécus de bons moments en congrès ; Benoit Grondin, pour ces soirées iconiques et ses blagues ; Mohammad Omrani pour son infinie gentillesse ; Sherin Nawaito et Sanaa Tork, avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger sur de nombreux sujets pendant toutes ces années ; Jacob Trudel pour sa bonne humeur constante et enfin Zoé Godefroid et Mylène Bourgeois, qui m'ont apporté leur aide précieuse pour les publications de cette thèse.

Merci également à tous les employés de l'UQAM : Denis Flipo pour son aide et la formation de haute qualité qu'il m'a donnée en microscopie confocale et tri cellulaire ; le personnel de l'animalerie de l'UQAM auprès de qui j'ai énormément appris et qui ont rendu ces travaux de recherche possibles ; les membres du Comité

Institutionnel de Protection Animal avec qui j'ai eu la chance de collaborer en tant que membre étudiant ; et Hermance Beaud pour sa bienveillance et son écoute pendant nos pauses déjeuner. Je souhaiterais également remercier chaleureusement les professeurs de l'étage et du département, pour leur profonde humanité et gentillesse, qui se sont toujours rendus disponibles pour prodiguer d'excellents conseils et participer aux jurys du projet de thèse et de l'examen doctoral : Said Kourrich, François Dragon, François Ouellet, et Benoit Vanderperre.

Cette thèse aurait été bien plus difficile sans le soutien des étudiants appartenant aux autres équipes de recherche. Damien et William, merci d'avoir formé avec moi un trio inséparable et de m'avoir aidée lors de multiples reprises à prendre du recul sur cette thèse. Je suis persuadée que nous avons tissé des liens d'amitié qui dureront pour la vie.

De même, ce travail n'aurait pas été possible sans tout le support que j'ai reçu à l'extérieur de l'UQAM. Tout d'abord à Montréal, Alexandra et Emmanuel, votre amitié indéfectible a été un pilier essentiel de ces 6 années passées ici. Merci du fond du cœur d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir soutenue dans les moments difficiles. J'espère pouvoir vous rendre au moins le quart de ce que vous m'avez apporté tout le long de ces années et j'ai conscience que ces mots ne témoignent qu'à peine toute la reconnaissance que je ressens à votre égard. J'aimerais également remercier toutes celles et ceux qui ont fait partie de ma vie ici, et dont la présence m'a aidée à traverser toutes les difficultés : Paul et Oswald, Ysaline, Claire-Marie, Nicolas C., Antoine et Marie-K., les filles du club de lecture, Jonathan, Félix et Julien.

Puis en France, Adrien A., Adrien L. et Hughes, qui ont toute ma reconnaissance pour avoir conservé des liens chers à mon cœur malgré la distance, mais également pour nos nombreuses conversations sur la vie académique. Merci infiniment pour votre amitié précieuse.

J'aimerais également avoir un mot pour mon assistante d'écriture de thèse, Bergamote. Qui a accompagné cette période d'écriture de miaulements adorables, câlins tout doux et siestes paisibles quand je suais sang et eau sur ce manuscrit.

Je voudrais terminer ces remerciements par les personnes les plus importantes, qui ont fait de mon parcours de vie ce qu'il est aujourd'hui : mes parents Odile et Dominique, mes grands-parents Andrée et Michel, et mon oncle Jérôme. Je ne sais pas comment vous remercier suffisamment pour l'incroyable chance que vous m'avez donnée depuis enfant. Vous avez toujours tout fait pour que je grandisse dans un environnement profondément aimant et stimulant intellectuellement, que je puisse m'épanouir et aller au maximum de mon

potentiel. Merci d'avoir tant investi en moi et mes lubies, ce qui m'a permis de réaliser mes ambitions folles de faire de longues études et de partir à l'étranger dans des conditions exceptionnelles. Merci de m'avoir soutenue émotionnellement au travers de toutes les difficultés que j'ai traversées et d'avoir suivi avec tant d'intérêt cette aventure canadienne, au point de venir me rejoindre ici pour certains d'entre vous. Je vous suis profondément reconnaissante pour tout. Un milliard de mercis.

Enfin, j'ai une pensée émue pour mon grand-père Michel, qui s'est éteint avant la fin de ce doctorat. En sa mémoire, cette thèse lui est dédiée.

« Il faut porter encore en soi un chaos,
pour pouvoir mettre au monde une étoile dansante. »

Friedrich Nietzsche, Ainsi parlait Zarathoustra,

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xiii
RÉSUMÉ	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1 Le système nerveux entérique.....	4
1.1.1 Structure du système nerveux entérique	4
1.1.2 Développement du système nerveux entérique	11
1.1.2.1 Progéniteurs du système nerveux entérique	11
1.1.2.2 Colonisation de l'intestin par les cellules de la crête neurale.....	15
1.1.2.3 Différenciation des progéniteurs	19
1.1.2.4 Morphogenèse et gangliogenèse du système nerveux entérique	21
1.1.2.5 Développement et maturation postnatale du système nerveux entérique	23
1.1.2.5 Développement et maturation postnatale du système nerveux entérique	23
1.2 Les cellules gliales entériques.....	25
1.2.1 Historique des cellules gliales entériques	25
1.2.2 Développement des cellules gliales entériques.....	26
1.2.2.1 Différenciation séquentielle des progéniteurs en cellules gliales entériques	26
1.2.2.2 Régulateurs génétiques impliqués dans la gliogenèse entérique embryonnaire.....	29
1.2.2.3 Développement et maintien postnatal des cellules gliales entériques	31
1.2.3 Diversité gliale.....	32
1.2.3.1 Marqueurs moléculaires canoniques des cellules gliales entériques	33
1.2.3.2 Identification de nouvelles populations gliales par séquençage de cellules uniques	34
1.2.3.3 Classification topo-morphologique des cellules gliales entériques.....	38
1.2.4 Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques.....	43
1.2.4.1 Rôle de support.....	43
1.2.4.2 Neurogenèse	43
1.2.4.3 Circuits nerveux moteurs.....	44
1.2.4.4 Fonctions épithéliales	45
1.2.4.5 Régulation immunitaire	45
1.3 Les neurocristopathies	47

1.3.1	La maladie de Hirschsprung	47
1.3.2	Le syndrome de Waardenburg.....	51
1.3.3	Le modèle murin $\text{Nr2f1}^{\text{Spt/Spt}}$	52
1.3.4	Nr2f1 et la gliogenèse.....	56
1.4	Hypothèses et objectifs	57
CHAPITRE 2 ENTERIC GLIAL CELL DIVERSIFICATION IS INFLUENCED BY SPATIOTEMPORAL FACTORS AND SOURCE OF NEURAL PROGENITORS IN MICE		60
2.1	Résumé.....	61
2.2	Abstract.....	62
2.3	Introduction.....	63
2.4	Materials and methods	65
2.4.1	Mice	65
2.4.2	Sample collection and processing.....	65
2.4.3	Whole-mount immunofluorescence staining.....	66
2.4.4	Imaging and data analysis.....	66
2.4.5	Statistics.....	66
2.5	Results.....	67
2.5.1	Topo-morphological subtypes of EGCs emerge sequentially during postnatal maturation of the myenteric plexus.	67
2.5.2	Topo-morphological subtypes of EGCs emerge sequentially during postnatal maturation of the submucosal plexus, but in a different order compared to the myenteric plexus.....	69
2.5.3	SCPs preferentially contribute to specific topo-morphological EGC subtypes, which vary depending of bowel segment.....	70
2.6	Discussion.....	71
2.7	Conflict of Interest	74
2.8	Author Contributions	74
2.9	Funding	74
2.10	Acknowledgments	74
2.11	Data availability Statement.....	74
2.12	Tables and figures.....	74
CHAPITRE 3 IN VIVO EVIDENCE OF A HIERARCHICAL MODE OF ENTERIC GLIAL CELL DIVERSIFICATION AND INTRINSIC DEVELOPMENTAL PLASTICITY WITHIN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM		103
3.1	Résumé.....	104
3.2	Abstract.....	105
3.3	Introduction.....	106
3.4	Materials and methods	108
3.4.1	Mice	108

3.4.2 Sample collection and processing.....	108
3.4.3 Whole-mount immunofluorescence staining.....	108
3.4.4 Imaging and data analysis.....	109
3.4.5 Statistics.....	109
3.5 Results.....	110
3.5.1 Emergence of EGC topo-morphological subtypes is altered in the ileal myenteric plexus of <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice.....	110
3.5.2 Emergence of EGC topo-morphological subtypes is altered in the ileal submucosal plexus of <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice.....	112
3.5.3 Post-natal adaptative compensation in the ileal ENS of <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice includes a cell population with mixed neuronal-glial identity and an increased contribution by SCPs.....	113
3.6 Discussion.....	115
3.7 Conflict of Interest.....	117
3.8 Author Contributions	118
3.9 Funding	118
3.10 Acknowledgments	118
3.11 Data availability Statement.....	118
3.12 Table and figures	118
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	143
4.1 Limites de la quantification des sous-types topo-morphologiques de CGE	145
4.2 De l'intérêt d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires	148
4.3 Étudier la diversification gliale par scRNA-seq	151
4.4 Diversification gliale et changements structuraux tissulaires	152
4.5 Étudier la diversité gliale dans le contexte des thérapies régénératives du SNE.....	154
4.6 Contribution des PCS dans la diversification gliale	155
4.6.1 Dans un contexte physiologique	155
4.6.2 Dans un contexte pathologique.....	156
4.7 Anomalies phénotypiques des zones ganglionnaires dans le contexte d'HSCR	157
4.8 Rôle de Nr2f1 dans la diversification gliale et la contribution des PCS.....	158
CONCLUSION	160
APPENDICE A HARNESSING THE POWER OF ENTERIC GLIAL CELLS' PLASTICITY AND MULTIPOTENCY FOR ADVANCING REGENERATIVE MEDICINE	161
APPENDICE B SUCCESS OF GDNF-BASED TREATMENT OF HIRSCHSPRUNG DISEASE DEPENDS ON NCAM1 SIGNALING AND VARIOUS SUBTYPES OF ENTERIC NEURAL PROGENITORS	162
APPENDICE C PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES	163

RÉFÉRENCES.....	165
-----------------	-----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : L'innervation du tractus gastrointestinal.....	5
Figure 1.2 : Organisation du système nerveux entérique.....	7
Figure 1.3 : Représentation des circuits nerveux du SNE régulant les fonctions gastrointestinales	8
Figure 1.4 : Formation et multipotence des CCN	13
Figure 1.5 : Distribution spatio-temporelle des CCN	14
Figure 1.6 : Voies migratoires des différentes sous-populations de CCN	17
Figure 1.7 : Marqueurs spécifiques clés lors de la formation du SNE.....	28
Figure 1.8 : Expression de GFP par différents sous-types topo-morphologiques de CGE individualisés chez des souris Sox10Cre MADM.	41
Figure 1.9 : Distribution de l'expression de SLC18A2 dans le plexus myentérique de souris WT à P10. .	42
Figure 1.10 : La maladie de Hirschsprung, le SNE et les manifestations cliniques	49
Figure 1.11 : Les différents sous-types de la maladie de Hirschsprung et leur diagnostic radiologique.	50
Figure 1.12 : Criblage génétique basé sur la pigmentation.....	53
Figure 1.13 : Phénotype et atteinte gastrointestinale des souris <i>Nr2fl^{Spt/Spt}</i>	55
Figure 2.1 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal myenteric plexus of the distal ileum. ...	77
Figure 2.2 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal myenteric plexus of the distal colon....	79
Figure 2.3 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal submucosal plexus of the distal ileum..	81
Figure 2.4 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal submucosal plexus of the distal colon..	83
Figure 2.5 : Global analysis of the SCP contribution to enteric gliogenesis.....	85
Figure 2.6 : Detailed analysis of the SCP contribution to EGC diversity.....	87
Figure 3.1 Analysis of EGC diversification in the postnatal myenteric plexus and circular muscle layer of the distal ileum from WT and <i>Nr2flSpt/Spt</i> mice.	122
Figure 3.2 Analysis of structural maturation of the postnatal myenteric plexus and circular muscle layer in the distal ileum of WT and <i>Nr2fl^{Spt/Spt}</i> mice.	124

Figure 3.3 Analysis of EGC diversification in the postnatal submucosal plexus of the distal ileum from WT and <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice	126
Figure 3.4 Analysis of structural maturation of the postnatal submucosal plexus in the distal ileum of WT and <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice	128
Figure 3.5 Analysis of the S100 β + HuC/D+ cell population in the myenteric plexus of the distal ileum from WT and <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice.....	130
Figure 3.6 Analysis of the SCP contribution to EGC diversification in the distal ileum of control and <i>Nr2f1^{Spt/Spt}</i> mice.....	132
Figure 4.1 : Sous-types gliaux morphologiques et topo-morphologiques additionnels.....	147
Figure 4.2 : Quantification de la population de CGE GFP+	150

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Récapitulatif des sous-types transcriptionnels de CGE	37
Table 2.1 : Percentage overlap between SOX10 and S100 β staining.....	74
Table 1.S1 : Oligonucleotide primers used for genotyping.	73
Table 1.S1 : Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence.	74
Table 3.S2 : Oligonucleotide primers used for genotyping.	117
Table 3.S2 : Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence.	118

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ACh : Acétylcholine

BMP : Protéines osseuses morphogéniques – *Bone morphogenic protein*

CCN – NCC : Cellule de la crête neurale – *Neural crest cell*

CGE - EGC : Cellule gliale entérique – *Enteric glial cell*

FABP7 : Protéine de liaison aux acides gras 7 – *Fatty Acid Binding Protein 7*

FVB : *Friend leukemia virus B*

GDNF : Facteur neurotrophe dérivé de la glie – Glial-derived neurotrophic factor

GFAP : Protéine acide fibrillaire gliale – *Glial Fibrillary Acidic Protein*

GFP : Protéine fluorescente verte – *Green Fluorescent Protein*

HSCR : Maladie de Hirschsprung – *Hirschsprung disease*

P : Jour postnatal – *postnatal day*

PDGFR α : Le récepteur A du facteur de croissance dérivé des plaquettes – *Platelet-derived growth factor receptor A*

PLP1 : Protéolipide protéine 1 – *Proteolipid Protein 1*

PM : Plexus myentérique

PSM : Plexus sous-muqueux

NR2F1 : Membre 1 du groupe F de la sous famille 2 des récepteurs nucléaires – *Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 1*

PCS – SCP : Précurseur de cellules de Schwann – *Schwann cell precursor*

scRNA-seq : Séquençage ARN de cellules uniques – *Single-cell RNA-sequencing*

SD : Déviation standard – *Standard deviation*

SNE – ENS : Système nerveux entérique – *Enteric nervous system*

SOX10 : Facteur de transcription à boîte SRY 10 – SRY-Box Transcription Factor 10

SW1-2-3-4 : Syndrome de Waardenburg de type I à IV

WT : Souche sauvage – Wild Type

YFP : Protéine fluorescente jaune Yellow – Fluorescent Protein

RÉSUMÉ

Longtemps considérées comme de simples cellules de soutien, les cellules gliales entériques apparaissent aujourd’hui comme des acteurs centraux du fonctionnement intestinal, caractérisées par une importante hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle. Cependant, les mécanismes développementaux qui sous-tendent cette diversité demeurent encore méconnus. Cette thèse explore ainsi la diversification de ces cellules dans des conditions physiologiques et dans le contexte pathologique du syndrome de Waardenburg de type IV. Dans un premier article, nous avons caractérisé un modèle murin développemental séquentiel des sous-types topo-morphologiques de cellules gliales entériques, qui s’est avéré être influencé par des facteurs spatio-temporels. Nous avons démontré que les précurseurs de cellules de Schwann contribuent à la diversification gliale, différentiellement selon la région étudiée, et préférentiellement à certains sous-types gliaux. Ces travaux établissent ainsi un cadre de référence pour évaluer le statut physiologique du SNE dans divers contextes pathologiques ou thérapeutiques. Dans un second article, nous avons exploré la diversification gliale ainsi que le développement postnatal du SNE, dans un modèle murin du syndrome de Waardenburg de type IV, qui présente un mégacôlon aganglionnaire suite à une gliogenèse embryonnaire prématurée. Dans l’iléon distal ganglionnaire, nous avons mis en évidence des altérations majeures de la diversification gliale et de la maturation postnatale, une contribution accrue des précurseurs de cellules de Schwann, ainsi que l’apparition d’une population cellulaire aux caractéristiques neuro-gliales. Ces observations démontrent que la perturbation de la colonisation des cellules de la crête neurale, impacte la diversification postnatale du SNE, même dans des zones ganglionnaires. Enfin, la discussion générale met en lumière l’importance d’étudier la diversification gliale pour mieux comprendre les neurocristopathies et développer des approches thérapeutiques innovantes. Elle propose également de nouvelles pistes de recherche pour faire suite à ces travaux.

Mots clés : cellules gliales entériques, système nerveux entérique, syndrome de Waardenburg de type IV, maladie de Hirschsprung, *Nr2f1*, cellules de la crêtes neurales, précurseurs de cellules de Schwann, développement postnatal, diversification gliale.

ABSTRACT

Long regarded as supporting cells, enteric glial cells are now recognized as central players in intestinal function, characterized by substantial molecular and functional heterogeneity. However, the developmental mechanisms underlying this diversity remain poorly understood. This thesis investigates the diversification of enteric glial cells under both physiological conditions and in the pathological context of Waardenburg syndrome type IV. In a first study, we characterized a sequential developmental model of topomorphological enteric glial subtypes, which proved to be influenced by spatial and temporal factors. We demonstrated that Schwann cell precursors contribute to glial diversification in a region-dependent manner, with a preferential involvement in specific subtypes. These findings provide a reference framework to assess the physiological status of the enteric nervous system in various pathological or therapeutic contexts. In a second study, we investigated glial diversification and postnatal development of the enteric nervous system in a mouse model of Waardenburg syndrome type IV, which develops an aganglionic megacolon as a consequence of premature embryonic gliogenesis. In the ganglionated distal ileum, we identified major alterations in glial diversification and postnatal maturation, an increased contribution of Schwann cell precursors, and the emergence of a neuro-glial hybrid population. These results demonstrate that impaired colonization by neural crest cells significantly impacts postnatal diversification of the enteric nervous system, even within ganglionated regions. Finally, the general discussion highlights the importance of studying glial diversification to improve our understanding of neurocristopathies and to foster the development of innovative therapeutic strategies. It also proposes new avenues of research that build on the findings of this thesis.

Keywords : enteric glial cells, enteric nervous system, Type IV Waardenburg syndrome, Hirschsprung disease, *Nr2f1*, neural crest cells, Schwann cell precursors, postnatal development, glial diversification.

INTRODUCTION

Le système nerveux entérique (SNE) est une subdivision du système nerveux périphérique dédiée à la régulation des fonctions gastrointestinales. Globalement, il se compose de deux plexus (ou réseaux) dans lesquels s'associent des neurones et des cellules gliales entériques (CGE) formant ensemble des ganglions nerveux. Historiquement, ces deux populations cellulaires ont été hiérarchisées fonctionnellement, réduisant longtemps les CGE comme de simples cellules de soutien aux neurones. Néanmoins, l'accumulation de preuves concernant leurs rôles centraux dans le fonctionnement du SNE et dans la physiopathologie de plusieurs maladies a suscité, depuis deux décennies, un regain d'intérêt pour ces cellules. Les récentes avancées technologiques (imagerie à haute résolution, séquençage haut débit,), ont permis de révéler l'importante diversité moléculaire, transcriptionnelle et fonctionnelle des CGE, bien que cette diversité demeure encore moins bien caractérisée que celle des neurones entériques. De plus, dans le domaine spécifique de la biologie du développement, la question de l'acquisition de la diversité gliale est encore à explorer.

Le SNE dérive principalement de deux types de précurseurs : les cellules de la crête neurale (CCN) et les précurseurs de cellules de Schwann (PCS), eux même dérivant des CCN. La perturbation des processus développementaux responsables de la colonisation de l'intestin par ces précurseurs entraîne l'apparition de neurocristopathies. Le syndrome de Waardenburg de type IV (SW4), également appelé syndrome de Waardenburg-Shah, en fait partie. Cette pathologie rare et congénitale, qui affecte moins de 1/1 000 000 nouveau-nés, se manifeste notamment par des malformations crâno-faciales, des défauts de pigmentation des yeux, de la peau et des poils, et un dysfonctionnement de l'oreille interne. De plus, le type IV est comorbide avec la maladie de Hirschsprung (HSCR), ou mégacôlon aganglionnaire. Dans cette pathologie, un défaut de colonisation des CCN dans le côlon entraîne une absence de formation du SNE, sur une portion variable du rectum et du côlon. La contraction tonique de la zone aganglionnaire provoque alors, en amont, une accumulation de matière fécale responsable de la formation d'un mégacôlon. À ce jour, le traitement repose sur différentes méthodes de résection chirurgicale de la portion aganglionnaire, mais des symptômes, comme des obstructions ou des entérocolites inflammatoires, peuvent subvenir à long terme. C'est pourquoi une meilleure compréhension des mécanismes responsables du développement du SNE serait un apport non négligeable, tant à la mise au point de thérapies régénératives du SNE qu'à la compréhension des symptômes à long terme chez les patients.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre et vise à explorer la diversification gliale entérique au cours du développement postnatal, à la fois dans un contexte physiologique et dans un modèle murin du SW4.

Le premier chapitre est consacré à une revue des connaissances. Il aborde : 1) la structure, le développement et la maturation postnatale du SNE; 2) un bref historique sur les CGE, la gliogenèse entérique, la diversité et les fonctions physiologiques de ces cellules ; 3) les neurocristopathies, notamment HSCR et le SW4, ainsi qu'un modèle murin du SW4. Ce chapitre est complété en annexe par une revue de littérature publiée en 2023 dans le *International Journal of Molecular Science*. Elle traite de la diversité, la plasticité et la multipotence des CGE. Enfin, ce chapitre introduit les hypothèses et les objectifs de cette thèse.

Le deuxième chapitre est une étude qui se base sur une classification des CGE utilisant des critères topologiques et morphologiques. Elle décrit la diversification postnatale des CGE, en tenant compte des différences régionales, de l'axe séro-muqueux et des facteurs temporels. En plus de démontrer l'existence de différences développementales selon les facteurs susnommés, cet article utilise un système génétique de traçage de lignée cellulaire, et mets en lumière la contribution des PCS à la diversification gliale. Ce travail constitue la première description détaillée de l'émergence postnatale des sous-types topo-morphologiques de CGE. Cet article, publié en 2024 dans *Frontiers in Neuroscience*, établit un cadre de référence pour déterminer le statut physiologique du tractus gastrointestinal dans des contextes pathologiques ou dans celui des thérapies régénératives.

Le troisième chapitre est une étude qui s'inscrit dans la continuité du chapitre précédent, mais qui a été réalisée dans le contexte pathologique du SW4, via l'utilisation du modèle murin *Nr2f1^{Spt/Spt}*. Ce modèle a donné lieu à des travaux ultérieurs de notre laboratoire. Tout d'abord, une caractérisation approfondie de ce nouveau modèle a été précédemment réalisée. Puis plus récemment, une altération de la différenciation des PCS en mélanocytes de la peau et de l'oreille interne a été mis en évidence dans ce modèle. Le présent article caractérise les altérations de la diversification gliale, de la maturation postnatale du SNE, ainsi que de la contribution des PCS à cette diversification dans l'iléon distal du modèle *Nr2f1^{Spt/Spt}*. Il met également en évidence la présence d'une population cellulaire aux caractéristiques neurogliales qui dérivent aussi bien des CCN que des PCS. Cette étude démontre que l'altération de la colonisation des CCN a des conséquences sur le développement postnatal et la diversification gliale, dans une partie ganglionnaire d'un modèle murin atteint du mégacôlon aganglionnaire. Cet article a été soumis en septembre 2025 dans *Frontiers in Neuroscience*.

Le dernier chapitre est une discussion générale des études présentées dans les deux précédents chapitres. De nouvelles hypothèses qui en découlent seront proposées, afin de démontrer que de nouvelles pistes de recherche pourraient être explorées à la suite de cette thèse.

CHAPITRE 1

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le système nerveux entérique

1.1.1 Structure du système nerveux entérique

Le SNE est la plus grande subdivision du système nerveux périphérique, qui est dédiée à la régulation des fonctions et de l'homéostasie du tractus gastrointestinal. Contrairement aux autres organes périphériques, le tractus gastrointestinal possède un système nerveux intrinsèque qui peut agir de façon autonome, lorsqu'il est artificiellement isolé du système nerveux central (SNC) par section de l'innervation périphérique (Bayliss et Starling, 1899). Toutefois, le SNE et SNC sont aussi étroitement interconnectés via une innervation extrinsèque (Figure 1.1). Selon la région du GI, le degré de contrôle exercé par le SNC dans l'axe intestin-cerveau varie. Les mouvements de l'œsophage sont ainsi majoritairement régulés par le SNC, alors que le petit intestin et le côlon sont principalement contrôlés par le SNE (Furness, 2012).

Pour délimiter le rôle du SNE, il est nécessaire de comprendre l'ensemble des fonctions et défis auxquels est confronté le GI. Au-delà de la digestion du bol alimentaire, pour fournir l'organisme en énergie, nutriments, vitamines, fluides et électrolytes; le GI présente également un rôle dans la défense contre les micro-organismes, toxines et polluants ingérés en même temps que les aliments. Il déploie des mécanismes de défense contre sa propre capacité de digestion, mais également contre le stress mécanique amené par les mouvements intestinaux. Tout cela se place dans un contexte où il doit maintenir son intégrité physiologique ainsi qu'un environnement favorable pour le microbiote intestinal. L'ensemble de ces fonctions sont ainsi intégrées par le SNE interconnecté avec le SNC (Figure 1.1) (Sharkey et Mawe, 2023).

Composé de 168 millions de neurones chez l'humain, et un peu plus de 2,5 millions chez la souris (Michel *et al.*, 2022), des chiffres comparables à ceux de la moelle épinière, le SNE innervé la paroi intestinale du début de l'œsophage jusqu'au sphincter annal (Furness *et al.*, 2014). Ces neurones sont associés à des CGE, avec un ratio CGE/neurone moyen d'environ 1:1 chez l'humain (Hoff *et al.*, 2008), et 0.5-1:1 chez la souris (Gabella et Trigg, 1984; Rosenberg et Rao, 2021). Ensemble, ces cellules s'associent pour former des plexus ganglionnaires. Selon leur localisation, ces plexus régulent localement les tissus ainsi que les cellules

proximes des ganglions, dont les muscles lisses, les vaisseaux sanguins, les glandes et les cellules immunitaires.

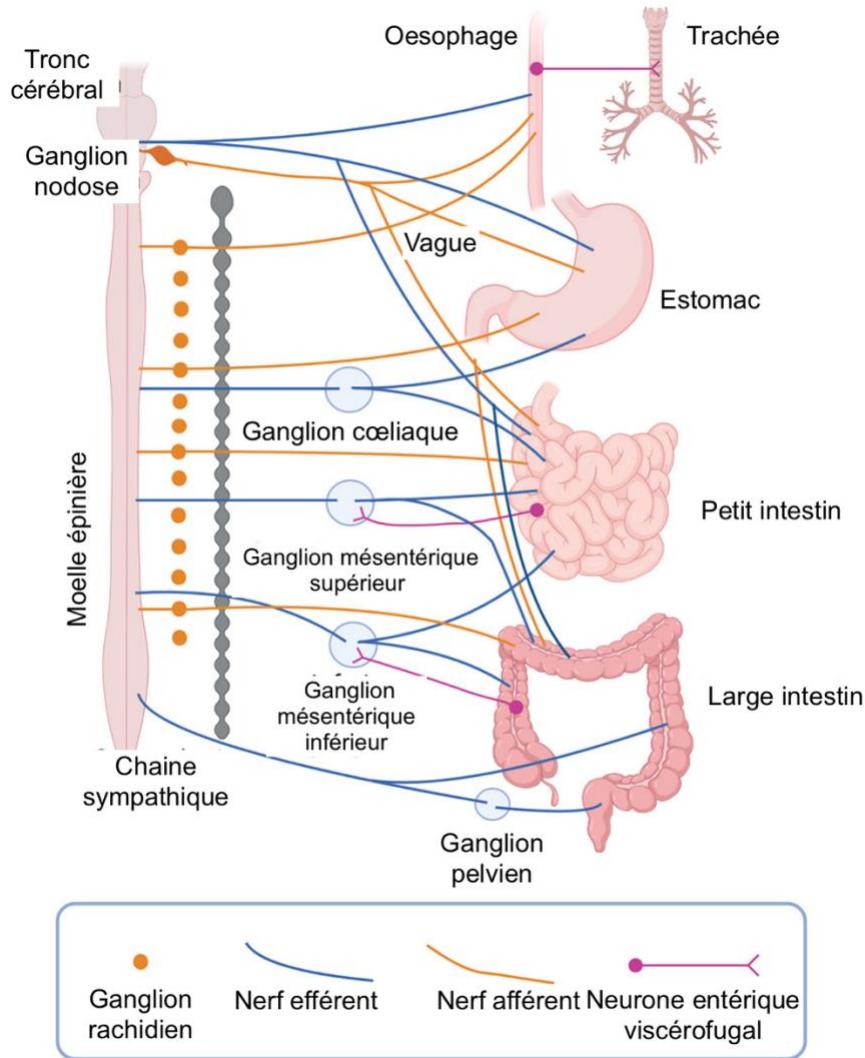


Figure 1.1 : L'innervation du tractus gastrointestinal

Le GI reçoit une innervation préganglionnaire parasympathique provenant des nerfs vagaux et pelviens, ainsi qu'une innervation sympathique efférente à partir des neurones postganglionnaires localisés dans les ganglions prévertébraux (céliaque, supérieur et inférieur mésentériques). Des neurones entériques viscérofugues envoient les signaux provenant du petit et large intestin aux ganglions sympathiques et depuis l'œsophage à la trachée. A partir de l'intestin des neurones primaires afférents envoient des signaux au SNC. Les ganglions nodulaires contiennent les corps cellulaires des afférences vagales, et les nerfs afférents primaires spinaux avec les nerfs splanchniques pelviens et sympathiques, ont leurs corps cellulaires localisés dans les ganglions rachidiens dorsaux. Les fibres efférentes sympathiques et parasympathiques innervent le SNE et non les muscles lisses et les tissus muqueux, excepté une innervation sympathique directe des artères sous-muqueuses et des muscles lisses sphinctériens. Schéma adapté de (Sharkey et Mawe, 2023).

Le plexus myentérique (PM), ou plexus d'Auerbach chez l'humain, est situé entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires. Le plexus sous-muqueux (PSM), ou plexus de Meissner chez l'humain, est localisé au niveau de la sous-muqueuse entre la couche musculaire lisse circulaire et la muqueuse (Figure 1.2). Chez les rongeurs, le PSM se compose d'une seule couche ganglionnaire, alors que chez les plus grands mammifères comme l'humain, il est constitué de deux couches (Brehmer *et al.*, 2010; Sharkey et Mawe, 2023). En plus des faisceaux de fibres interganglionnaires connectant les ganglions, des projections émergeant des plexus interconnectent le PM et le PSM. Le PM existe dans toute la longueur de l'intestin ; alors que le PSM est absent de l'œsophage, rare dans l'estomac et se localise principalement dans le petit et gros intestin (Furness *et al.*, 2014).

Comme indiqué plus haut, le degré de contrôle de la motilité intestinale par le SNE varie en fonction de la région. Au niveau du petit et gros intestin, le PM contrôle principalement la motricité intestinale. Cela englobe notamment la propulsion (péristaltisme) et le brassage (segmentation) du bol alimentaire vers l'anus, le complexe moteur migrant qui permet de nettoyer les résidus alimentaires de l'intestin (Takahashi, 2013), mais également l'expulsion des substances nocives par vomissement (Furness, 2012). À titre d'exemple, un circuit neuronal intrinsèque au SNE régule le péristaltisme comme suit. Un stimulus chimique ou mécanique subvient dans la lumière intestinale et stimule les prolongements des neurones sensoriels du PM, situés sous la couche épithéliale de la muqueuse. Ces neurones aussi appelés afférents primaires intrinsèques, induisent l'activation d'interneurones ascendants et descendants. Les interneurones ascendants activent les motoneurones excitateurs qui provoquent la contraction des muscles lisses du côté oral, c'est-à-dire en amont du contenu luminal. Alors que les interneurones descendants activent les motoneurones inhibiteurs menant à une relaxation musculaire du côté anal, en aval du contenu luminal (Sharkey et Mawe, 2023). Ce processus mobilise à la fois les muscles lisses longitudinaux et circulaires (Wood, 2016), permettant ainsi d'accomplir la propulsion du bol alimentaire (Figure 1.3).

En plus des cellules du SNE, d'autres types cellulaires sont impliqués dans la régulation de la motilité intestinale, comme les cellules interstitielles de Cajal et les cellules exprimant le récepteur A du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR α - Platelet-derived growth factor receptor A). Les cellules interstitielles de Cajal sont situées dans les muscles lisses, le PM et au bord des nerfs. Dans le PM, elles jouent un rôle de générateur de l'activité contractile rythmique; et dans les muscles, avec les cellules PDGFR α , elles modulent la neurotransmission excitatrice et inhibitrice. Ces deux types cellulaires sont associés aux cellules musculaires lisses avec des jonctions serrées, formant ensemble un syncytium (Sanders *et al.*, 2016) (Figure 1.2).

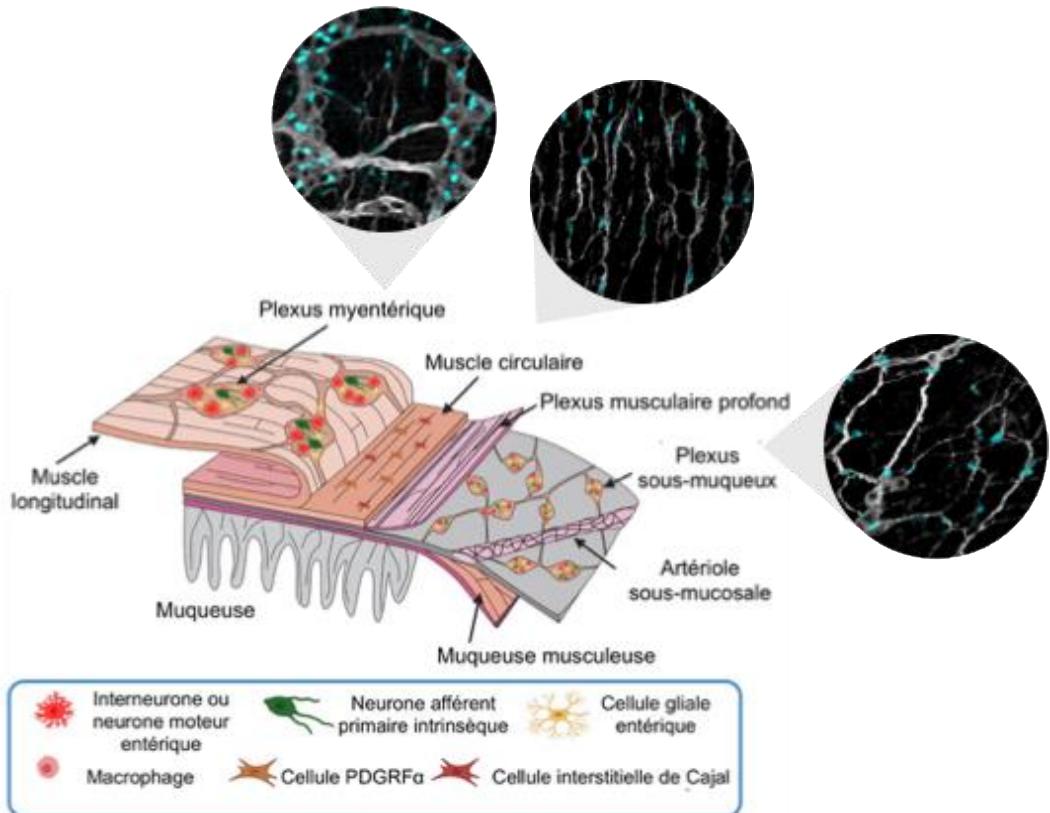


Figure 1.2 : Organisation du système nerveux entérique

Le plexus myentérique est situé entre les muscles lisses longitudinal et circulaire. Le PSM se trouve dans la sous-muqueuse. Chez les animaux plus grands que les rongeurs comme l'humain, ce plexus se compose d'une partie interne et externe. Différents types cellulaires interagissent entre eux dans les ganglions : les motoneurones, les interneurones, les neurones afférents primaires intrinsèques, les CGE, et les macrophages (voir la légende). Intercalées entre les fibres nerveuses, se trouvent les cellules interstitielles de Cajal, ainsi que les cellules PDGFR α . Ces types cellulaires sont aussi localisés dans les plexus, mais ne sont pas représentés dans ce schéma. Des faisceaux de fibres nerveuses connectent les ganglions entre eux et innervent les muscles longitudinal et circulaire, la couche musculaire de la muqueuse et la muqueuse. Des nerfs entériques innervent également les artères de la sous-muqueuse, ainsi que les tissus lymphoïdes associés à l'intestin. La muqueuse est innervée de façon dense. Les différentes vues de microscopie confocale montrent le plexus myentérique, la couche musculaire lisse circulaire et le plexus sous-muqueux. Sur ces images, les CGE expriment le marqueur glial SOX10 (Facteur de transcription à boîte SRY 10 - *SRY-Box Transcription Factor 10*), en turquoise et les fibres nerveuses sont délimitées par le marqueur neuronal β III-tubuline, en blanc. Schéma adapté de (Sharkey et Mawe, 2023) et (Lefèvre *et al.*, 2024)

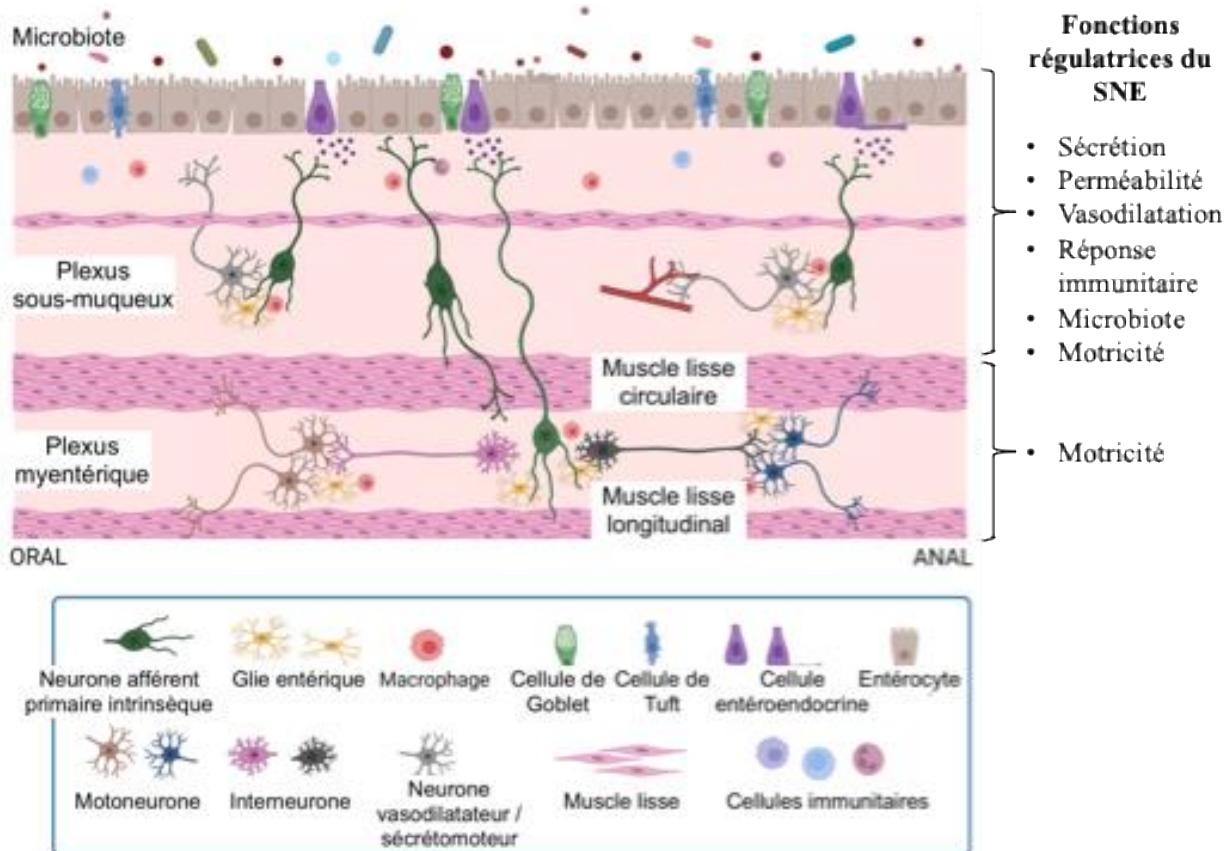


Figure 1.3 : Représentation des circuits nerveux du SNE régulant les fonctions gastrointestinales

Résumé de l'ensemble des fonctions et des principales populations cellulaires du GI. Le PM présente des circuits réflexes autonomes régulant la motricité, qui projettent sur les couches musculaires lisses circulaire et longitudinale. Des prolongements de neurones afférents primaires émergent du PM et se projettent au niveau de la muqueuse. Le PSM présente également des circuits réflexes intrinsèques régulant la sécrétion, la perméabilité, la vasodilatation et la motricité. Le microbiote communique avec les cellules épithéliales, dont les cellules entéroendocrines, les cellules de Tuft et les cellules immunitaires dans la lamina propria. Ces cellules interagissent à leur tour avec les fibres nerveuses et CGE, pour moduler les fonctions du GI. Ces interactions sont bidirectionnelles car des altérations de la motilité intestinale et de la sécrétion peuvent moduler le microenvironnement microbien. Schéma adapté de (Sharkey et Mawe, 2023)

Quant au PSM, il contient des circuits neuronaux intrinsèques contrôlant le maintien de la barrière épithéliale, la sécrétion et la régulation du flux sanguin. Chez les grands mammifères et l'humain, le PSM est également impliqué dans la motilité, en projetant des fibres nerveuses vers la couche musculaire circulaire, mais ce circuit réflexe n'a pas été entièrement caractérisé (Sharkey et Mawe, 2023). Il faut noter que les prolongements du SNE ne résident pas dans l'épithélium intestinal, mais des cellules spécialisées qui le sont, jouent le rôle de senseurs. Il s'agit des cellules entéroendocrines et des cellules de Tuft, qui ont la capacité de répondre à des stimuli mécaniques (comme la distension) et chimiques (médiateurs microbiens, nutriments, toxines, irritants) (Cheng *et al.*, 2018; Diwakarla *et al.*, 2017; Neunlist et Schemann, 2014). Elles transduisent ensuite ces signaux de façon synaptique et paracrine aux prolongements nerveux et aux CGE (Figure 1.3).

Le SNE régule d'autres fonctions liées à la barrière intestinale, qui consiste en une monocouche de cellules épithéliale polarisées. Cette couche est maintenue par des jonctions serrées formées grâce à l'interaction de protéines transmembranaires (occludines, claudines, molécules d'adhésion jonctionnelles), ancrées au cytosquelette par des protéines d'échafaudage (zonula occludens 1 (ZO-1)) (Otani et Furuse, 2020). Elle forme une barrière sélective qui régule le passage des nutriments, de l'eau, des électrolytes par transport paracellulaire et transcellulaire et empêche le passage des toxines, des pathogènes, des bactéries commensales et de la plupart des antigènes (Odenwald et Turner, 2017). Le SNE participe au renouvellement de cette barrière en stimulant la prolifération et la différenciation épithéliale via l'action de divers médiateurs dont la sérotonine (5-HT - 5-hydroxytryptamine) et l'acétylcholine (ACh) sécrétée par des neurones sous-muqueux (Gross *et al.*, 2012; Hayakawa *et al.*, 2017). La perméabilité épithéliale est également modulée par le SNE, car une inhibition de l'activité neuronale et de la signalisation cholinergique induit une augmentation de cette perméabilité (Cameron et Perdue, 2007; Overman *et al.*, 2012).

Une autre fonction de la barrière intestinale est la sécrétion qui permet la digestion du contenu stomacal, la neutralisation des acides gastriques et la protection de la muqueuse (Sharkey et Mawe, 2023). Le mucus est sécrété par les cellules à Goblet et les entérocytes (Pelaseyed *et al.*, 2014). De plus, des peptides antimicrobiens sont produits par les cellules de Paneth (Lueschow et McElroy, 2020) et des immunoglobulines (IgA polymériques) par l'épithélium (Brandtzaeg, 2013), qui renforcent ensemble la défense de la muqueuse. La régulation de la sécrétion se fait principalement par le PSM, via la sécrétion d'ACh ou de peptide intestinal vasoactif (VIP - vasoactive intestinal peptide), par des neurones sécrétomoteurs cholinergiques ou non-cholinergiques. Cela se produit parallèlement à la régulation de la vasodilatation, en réponse à des stimuli luminaux (Vanner et Macnaughton, 2004).

Le SNE régule également de manière étroite le fonctionnement du système immunitaire. Il joue un rôle dans la modulation du niveau d'inflammation, évitant ainsi des dommages aux tissus intestinaux tout en maintenant leur défense. En effet, une dérégulation de la réponse immunitaire peut causer le développement de maladies inflammatoires de l'intestin (Lee *et al.*, 2018). En plus des moyens de défense muqueux décrits plus haut, de nombreuses cellules immunitaires innées et adaptatives sont localisées dans la lamina propria, organisées en follicules lymphoïdes (incluant les plaques de Peyer et des follicules isolés), ou directement situées dans l'épithélium ou dans les muscles lisses (Populin *et al.*, 2021). L'interaction entre les cellules du SNE et les cellules immunitaires est bidirectionnelle. À titre d'exemple, les neurones entériques sensoriels peuvent être excités par des médiateurs inflammatoires comme l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes, les interleukines, les protéinases et la sérotonine. En retour, ils modulent les cellules immunitaires en stimulant leurs récepteurs aux neurotransmetteurs comme le VIP, le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP - Calcitonin gene-related peptide), les tachykinines, l'ACh, et le neuromédine U (Populin *et al.*, 2021). Cependant, cette communication se fait avec la participation d'un acteur essentiel dans le fonctionnement gastro-intestinal : le microbiote intestinal, qui affecte la signalisation neuro-immunitaire (Jacobson *et al.*, 2021).

En effet, le GI contient approximativement 10^{13} micro-organismes, composés de plus de 250 espèces de virus, mycètes, bactéries et archées ; ce qui est supérieur au nombre de cellules humaines (Sender *et al.*, 2016). Ce microbiote intestinal joue des rôles essentiels dans la digestion, le maintien de la barrière intestinale, la maturation du système immunitaire, ainsi que le fonctionnement et le développement postnatal du SNE (Di Vincenzo *et al.*, 2024; Kabouridis et Pachnis, 2015). Pour préserver l'homéostasie intestinale, le SNE et le microbiote interagissent ensemble. Par exemple, les neurones entériques et les CGE expriment les récepteurs de type Toll (TLR – Toll-like receptor) qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux microorganismes (Kabouridis et Pachnis, 2015). Ils expriment notamment le TLR4 activé par le lipopolysaccharide (LPS) bactérien. Cette interaction a notamment été identifiée pour réguler la motilité intestinale et promouvoir la survie neuronale (Anitha *et al.*, 2012). De façon réciproque, le microbiote peut être modulé directement par des neurotransmetteurs sécrétés par le SNE (Carabotti *et al.*, 2015).

Pour conclure, le SNE joue un rôle fondamental dans la régulation des fonctions physiologiques et de l'homéostasie du GI. Il s'illustre par sa capacité à intégrer, coordonner et moduler les fonctions motrices, sécrétoires, vasculaires et immunitaires, en interaction permanente avec le SNC et les signaux environnementaux. Ces fonctions sont rendues possibles par l'établissement d'un système nerveux dont l'architecture et les populations cellulaires sont hautement spécialisées. La section suivante est consacrée à décrire les processus développementaux sous-tendant la formation du SNE.

1.1.2 Développement du système nerveux entérique

1.1.2.1 Progéniteurs du système nerveux entérique

Il est à noter que cette partie traite principalement du développement du SNE chez la souris, qui constitue notre modèle expérimental. Cependant, certaines observations ont été également réalisées chez l'humain, des espèces aviaires ou encore le poisson-zèbre. Les temps développementaux indiqués correspondent ainsi au développement murin.

Différentes populations de progéniteurs sont à l'origine du SNE. Spécifiques aux vertébrés, les CCN présentent des capacités importantes de multipotence et de migration sur de longues distances (Pilon, 2021). Cette population transitoire contribue de façon si étendue à la formation de l'embryon, qu'elle a été considérée comme le quatrième feuillet germinal (les trois autres feuillets étant : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) (Hall, 2000). Différentes étapes sont responsables de la formation de ces cellules pendant le développement embryonnaire. 1) Lors du stade de gastrulation, les CCN sont induites au bord de la plaque neurale située à l'interface entre l'ectoderme non-neural, le neuroectoderme ainsi que le mésoderme paraxial. 2) Puis suit la neurulation, étape pendant laquelle la plaque neurale se plie dorsalement, rapprochant ainsi ses bords. Les CCN sont alors spécifiées et commencent à exprimer le facteur de transcription SOX10 (Southard-Smith *et al.*, 1998). 3). Une fois que la plaque neurale s'est refermée pour former le tube neural, les CCN passent par une transition épithélio-mésenchymateuse, se détachent du neuroépithélium et migrent vers diverses localisations cibles de l'embryon, où elles se différencieront. L'ensemble de ces étapes est finement régulé par des réseaux génétiques, qui ne seront pas détaillés ici, mais qui ont été largement décrits (Erickson *et al.*, 2023; Sauka-Spengler et Bronner-Fraser, 2008; Simões-Costa et Bronner, 2015; Szabó et Mayor, 2018). Ainsi, lors de leur migration dans les structures cibles, les CCN se différencient en divers types cellulaires distincts, sous l'influence combinée des signaux extrinsèques et des réseaux de régulation génétique intrinsèques (Erickson *et al.*, 2023). Elles peuvent ainsi donner naissance à un large éventail de cellules, que l'on peut classer comme : mésenchymateuses, nerveuses, sécrétoires et pigmentées (Figure 1.4) (Simões-Costa et Bronner, 2015). Une première observation en 1954, a montré que l'ablation du tube neural dorsal chez l'embryon de poulet résulte en une complète absence du SNE (Yntema et Hammond, 1954), ce qui démontre ainsi l'implication des CCN comme progéniteurs majeurs du SNE.

Cependant, toutes les CCN ne sont pas identiques entre elles dépendamment de leur origine. Selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon, les CCN possèdent des potentiels de différenciation distincts et n'emploient pas les mêmes voies de migration (Soldatov *et al.*, 2019). En fonction de cette régionalisation, on distingue quatre sous-populations de CCN (dans l'ordre antérieur à postérieur) : crânial, vagal, du tronc et sacral (Figure 1.5) (Pilon, 2021). Temporellement, les CCN crâniales constituent la première population à être

formée. Elles se différencient en chondrocytes et ostéocytes du squelette crânofacial, ainsi qu'en neurones sensoriels et cellules gliales des nerfs crâiaux (Kastschenko, 1888; Platt, 1897). Ensuite, se forment les CCN vagales, qui génèrent la majorité des neurones et cellules gliales du SNE (Yntema et Hammond, 1954). Un sous-groupe de CCN vagales, appelées CCN cardiaques, contribuent à la formation des muscles lisses des vaisseaux cardiaques et du septum interventriculaire (Arima *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2000). Ensuite, les CCN du tronc génèrent les neurones et les cellules gliales composant les ganglions dorsaux spinaux et sympathiques, les cellules chromaffines des glandes surrénales et contribuent aussi à la formation du SNE (Dushane, 1938; Green *et al.*, 2017; Teillet et Le Douarin, 1974). Enfin, les CCN sacrales entrent en jeu, et contribuent de façon minoritaire à la formation du SNE dans le côlon (Burns et Douarin, 1998; Wang *et al.*, 2011). Cette contribution des CCN vagales et sacrales au SNE a été initialement démontrée par l'ablation et la xénogreffe de portions spécifiques de la crête neurale provenant de l'embryon de caille, dont les cellules présentent un noyau très condensé et granuleux, dans l'embryon de poulet, dont les cellules présentent un noyau plus pâle et moins condensé. Cette méthode astucieuse exploite la morphologie spécifique des cellules de caille, qui présentent une condensation pour détecter les tissus cibles des sous-populations de CCN lors du développement embryonnaire (Le Douarin et Teillet, 1973).

La réalisation de xénogreffes et chimères a été particulièrement utilisée pour cartographier le destin cellulaire des sous-populations de CCN. Cependant, les avancées technologiques récentes, notamment avec le système Cre/LoxP, un outil génétique de traçage de lignée cellulaire, permettent d'étudier plus finement les processus développementaux des CCN, ainsi que toutes les populations cellulaires qui en sont dérivées. Dans ce système, l'expression de la recombinase Cre est sous le contrôle du promoteur d'un marqueur moléculaire connu pour les CCN (par exemple : *Wnt1-Cre* pour identifier les CCN pré-migratoires, ou *Sox10-Cre* pour les CCN migratoires). Quand la cellule exprime le marqueur d'intérêt, la recombinase Cre est exprimée et active. Celle-ci induit la recombinaison des séquences *LoxP* encadrant un codon stop qui précède un gène rapporteur. Par conséquent, cela permet de marquer spécifiquement les CCN et les cellules qui en dérivent, qui expriment un fluorophore. Ces cellules deviennent ainsi visualisables par microscopie confocale, ou isolables par cytométrie en flux (Debbache *et al.*, 2018; Pilon, 2021).

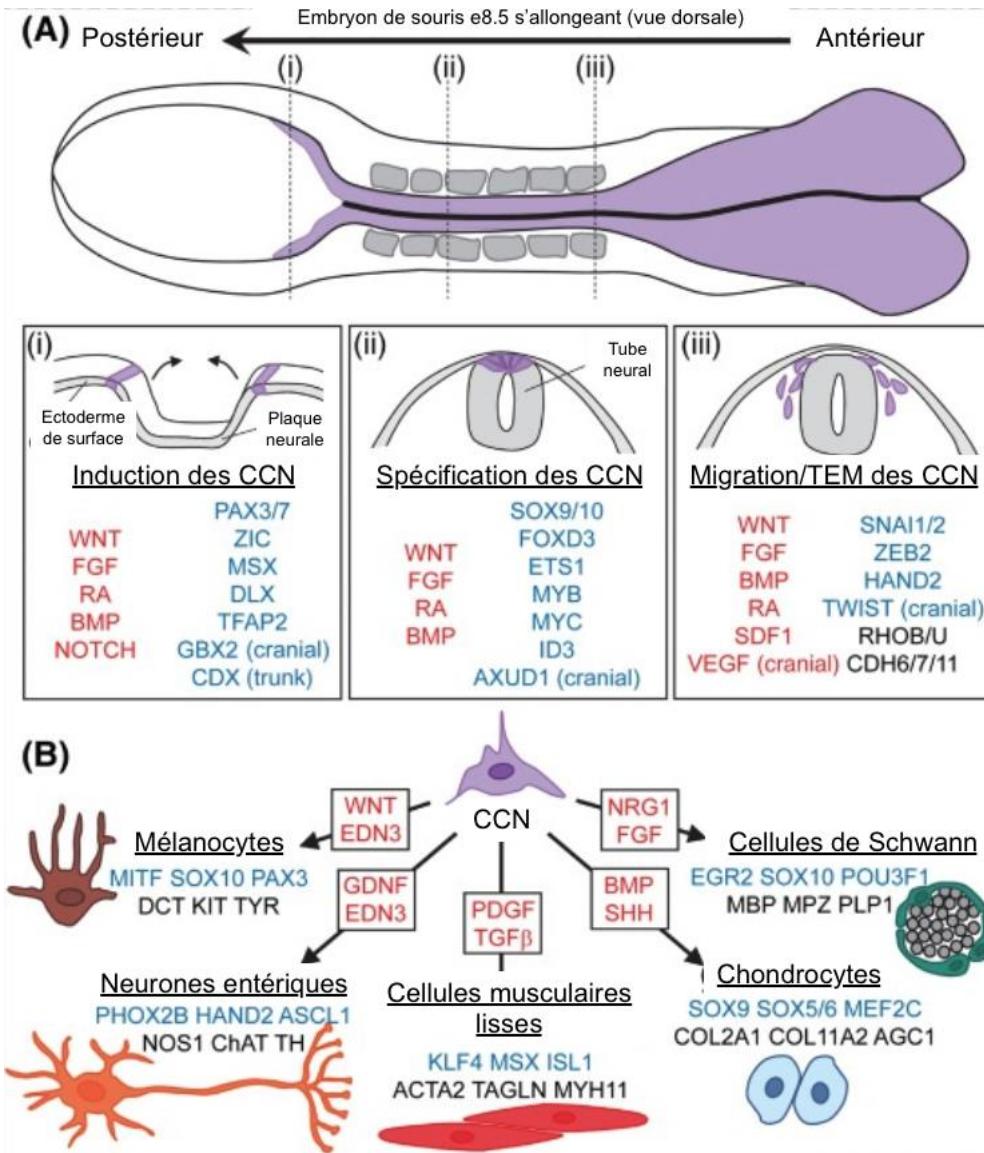
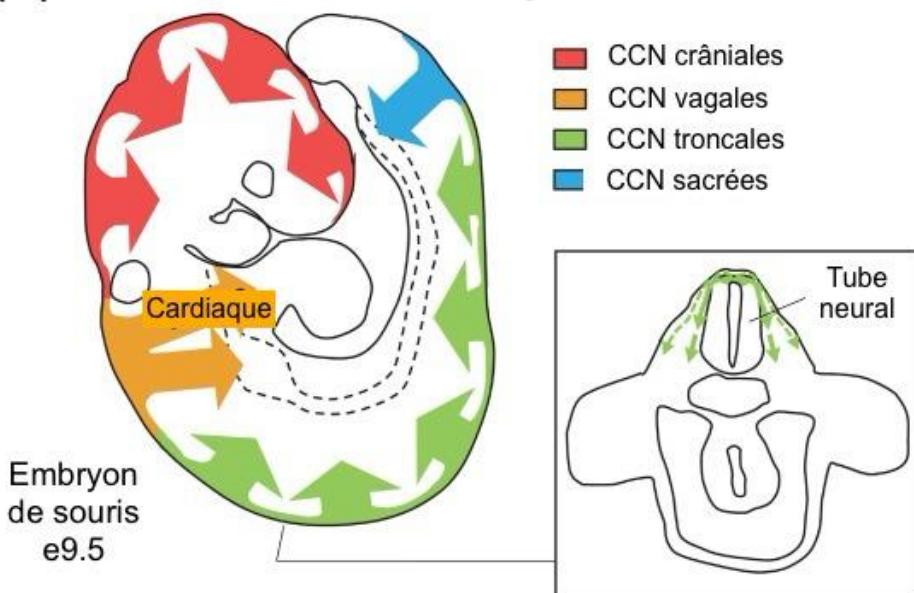


Figure 1.4 : Formation et multipotence des CCN

(A-D) Représentation schématique de la formation des CCN à partir de la plaque neurale de l'ectoderme. Les différentes étapes sont : (i) l'induction, (ii) la spécification, (iii) la transition épithélio-mésenchymateuse et la migration. (B) Les CCN sont des cellules multipotentes ayant la capacité de se différencier en une large palette de types cellulaires, dont les mélanocytes, les neurones entériques, les cellules musculaires lisses, les chondrocytes et les cellules de Schwann. EMT : Schéma adapté de (Pilon, 2021).

(A) Distribution spatiale



(B) Distribution temporelle

Stades Carnegie	8	10	12	14	16	18	20	22
Jours humains	19	22	28	33	40	44	52	56
Jours murins	8.5	9.5	10.5	11.5	12.5	13.5	14.5	15.5



Trends in Molecular Medicine

Figure 1.5 : Distribution spatio-temporelle des CCN

(A) Distribution spatiale des CCN au niveau de l'axe antéro-postérieur d'un embryon de souris au jour embryonnaire (E) 9.5. Les sous-populations de CCN sont : crâniales (en rouge), vagales (en orange), du tronc (en vert) et sacrales (en bleu). Ces populations emploient des voies migratoires distinctes selon les régions de destination où elles se différencieront. Une vue transversale du tronc montre la migration ventrale des CCN du tronc, à partir de la région du tube neural. (B) Distribution temporelle de la migration des CCN chez l'humain et la souris, et aux différents stades embryonnaires aussi appelés stades de Carnegie (corrélation de l'âge, la taille et les caractéristiques morphologiques de l'embryon humain). Les flèches de couleurs correspondent aux populations décrites en (A). Schéma adapté de (Pilon, 2021)

Il a été précédemment indiqué dans cette introduction que les CCN avaient la capacité de se différencier directement en cellules formant le SNE. Cependant, d'autres précurseurs dérivés des CCN sont également impliqués. En effet, les sous-populations de CCN ont la capacité de s'associer aux nerfs périphériques en formation lors de leur migration et d'adopter une identité transitoire de précurseur de cellule de Schwann (PCS) (Kastriti et Adameyko, 2017). Ces PCS, en plus de se différencier en cellules de Schwann qui s'associeront définitivement aux nerfs, présentent la capacité de générer d'autres populations cellulaires (Pilon, 2021). Ainsi, ces PCS migrent le long des nerfs, prolifèrent, et se disséminent dans l'ensemble de l'organisme via l'innervation périphérique en développement (Furlan et Adameyko, 2018; Heermann *et al.*, 2012). Ils se différencient ainsi en : mélanocytes de la peau et de l'oreille interne (Adameyko *et al.*, 2009; Bonnamour *et al.*, 2021), neurones autonomes (Dyachuk *et al.*, 2014; Espinosa-Medina *et al.*, 2014; Kastriti *et al.*, 2019) et entériques (Espinosa-Medina *et al.*, 2017; Uesaka *et al.*, 2015; Uesaka *et al.*, 2021), cellules chromaffines de la surrénale (Furlan *et al.*, 2017; Kastriti *et al.*, 2019), progéniteurs mésenchymaux dentaires (Kaukua *et al.*, 2014), fibroblastes endoneuriaux (Joseph *et al.*, 2004), chondrocytes crânio-faciaux et ostéocytes (Xie *et al.*, 2019). Les PCS expriment la protéine Desert hedgehog (DHH), connue pour être impliquée dans le développement de la gaine de myéline des nerfs périphériques (Parmantier *et al.*, 1999). Ainsi, comme avec les CCN, il est possible de se baser sur ce marqueur pour utiliser un système de traçage génétique de lignage cellulaire et étudier la contribution des PCS aux différentes populations cellulaires (Jaegle *et al.*, 2003).

L'origine du SNE à partir des CCN a été largement étudiée, cependant il n'existe que de rares mentions dans la littérature de précurseurs du SNE ne provenant pas de la crête neurale et ces articles décrivent une contribution très limitée. Une première étude sur l'embryon de poulet démontre que le duodénum et l'estomac peuvent être colonisés par des cellules migrant de la partie ventrale du tube neural. Ces cellules se différencient en neurones, CGE, cellules interstitielles de Cajal et cellules épithéliales, et contribuent au PM et au PSM, ainsi qu'au muscle lisse circulaire et à la muqueuse (Sohal *et al.*, 2002). Une seconde étude sur l'embryon de souris, décrit une contribution de l'endoderme pancréatique et duodénal aux neurones du PM de l'intestin proximal (Brokhman *et al.*, 2019). Ainsi, le SNE dérive principalement des CCN, des PCS et minoritairement d'autres sources de précurseurs. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous concentrer uniquement sur les sources progénitrices principales.

1.1.2.2 Colonisation de l'intestin par les cellules de la crête neurale

La colonisation du mésenchyme intestinal par les CCN est un processus finement régulé, dépendant de leur capacité de survie, prolifération, migration et différenciation (Nagy et Goldstein, 2017). Pour envahir le mésenchyme intestinal embryonnaire, les CCN emploient des voies de migration dépendantes de leur

origine selon l'axe antéro-postérieur de l'embryon (Figure 1.6). Chez la souris, lorsque les CCN migrent du neuroectoderme via les somites (division de mésoderme para-axial), elles acquièrent leur destin entérique sous l'influence du microenvironnement. De l'acide rétinoïque (RA) est produit localement dans le microenvironnement somitique par le mésoderme paraxial qui agit sur les récepteurs de l'acide rétinoïque RAR α , RAR β 2, RAR γ exprimés par les CCN, induisant en retour l'expression du récepteur tyrosine kinase RET (Cui *et al.*, 2003; Simkin *et al.*, 2013). Une disruption de la synthèse de RA dans l'embryon de souris par inactivation de la rétinaldéhyde déshydrogénase 2 entraîne l'absence de développement du SNE (Niederreither *et al.*, 2003).

À E9.5 chez la souris, les CCN vagales entrent dans la partie antérieure du mésenchyme intestinal. Ces CCN entériques (CCNE) vont migrer de façon rostro-caudale, atteignant l'estomac à E10.5, le cæcum à E11.5 et l'intestin postérieur à E14.5 (Young *et al.*, 2004) (Figure 1.6). Elles progressent à 40 $\mu\text{m/h}$ dans le mésenchyme intestinal. Au début de leur colonisation, les CCNE sont distribuées dans la partie externe du mésenchyme de l'intestin antérieur et médian, alors que les muscles lisses ne sont pas encore différenciés (Young *et al.*, 2004). Quand elles arrivent au cæcum, le muscle circulaire commence à se différencier et les CCNE se localisent à l'endroit du futur PM dans la couche la plus externe du mésenchyme intestinal, entre le muscle et la séreuse (Burns et Douarin, 1998; Kapur *et al.*, 1992). Un sous-groupe de CCNE passe par une voie détournée, en ne traversant pas le cæcum, mais en empruntant un raccourci de l'iléon vers le côlon via le mésentère (entre E13 et E14.5) (Nishiyama *et al.*, 2012). Grâce à cette migration trans-mésentérique plus rapide, ces cellules forment ainsi une grande partie du SNE du côlon. Dans un second temps, à partir de l'intestin moyen, les CCNE effectueront une migration radiale du PM vers l'épithélium intestinal pour coloniser le mésenchyme et former le PSM (Uesaka *et al.*, 2013). Enfin, les CCN sacrales migrent ventralement à partir de la région du tube neural à E9.5, atteignent la région postérieure de l'embryon pour former le plexus pelvien à E11.5, puis via les fibres nerveuses de ce plexus, envahissent la partie distale du côlon (Wang *et al.*, 2011) (Figure 1.6). Ces cellules entrent dans le mésenchyme intestinal seulement après que les CCNE vagales ont colonisé le côlon, et contribuent de façon minoritaire à la formation du SNE (environ 5-10% des neurones) en migrant de façon postéro-antérieure jusqu'à la hauteur du cordon ombilical (ici démontré dans le contexte du poulet) (Burns et Douarin, 1998).

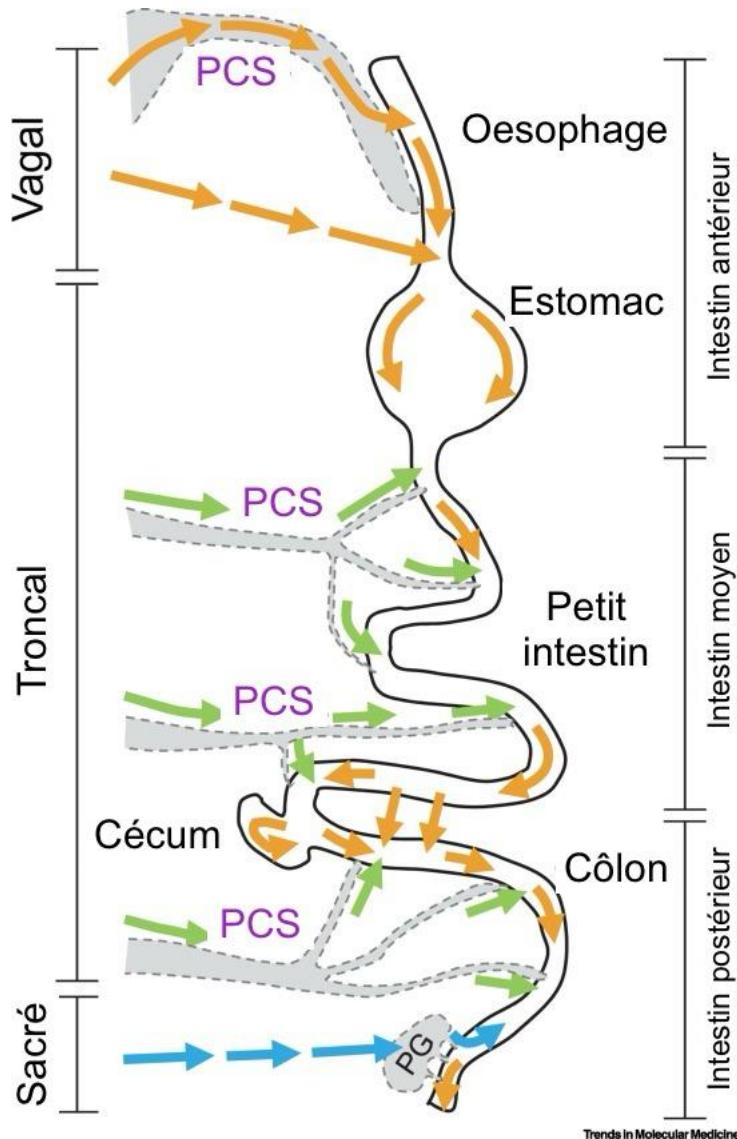


Figure 1.6 : Voies migratoires des différentes sous-populations de CCN

Représentation schématique des voies migratoires des différentes sous-populations de CCN. Les CCN et les PCS vagaux (en orange) entrent dans l'intestin antérieur puis migrent de façon rostro-caudale. Les PCS du tronc (en vert) entrent dans l'intestin moyen et postérieur, puis migrent de façon rostro-caudale et passent par la voie trans-mésentérique. Enfin, les CCN et les PCS sacraux (en bleu) entrent dans l'intestin postérieur via les ganglions pelviens (PG) et effectuent une migration caudo-rostrale. Adapté de (Pilon, 2021).

Comme indiqué précédemment, en plus des CCN vagales et sacrales, les PCS envahissent le mésenchyme intestinal via les nerfs extrinsèques, à partir du niveau vagal, du tronc et sacral (Figure 1.6). Uesaka et al. ont utilisé des systèmes génétiques de traçage cellulaire (exploitant l'expression du marqueur DHH par les PCS) pour décrire la contribution des PCS au SNE dans plusieurs contextes (Uesaka *et al.*, 2015; Uesaka *et al.*, 2021). En condition physiologique, ils ont démontré que les PCS envahissaient le PM du petit intestin dès E14.5, puis les couches plus profondes de la paroi intestinale lors du développement postnatal. Quant au côlon, la migration des PCS commence plus tardivement à E16.5. Il faut noter que cette contribution est régionalement différente entre l'iléon et le côlon. En effet, la contribution des PCS au plexus myentérique à 1 mois postnatal chez la souris s'est révélée être faible dans l'iléon et plus importante dans le côlon. Ces PCS possèdent la capacité d'adopter un destin neuronal et génèrent ainsi jusqu'à 20% des neurones entériques du PM et PSM du gros intestin (Uesaka *et al.*, 2015). À ce jour, il n'a pas encore été établi si les PCS contribuent également à la gliogenèse entérique postnatale. Cependant, dans un modèle murin de HSCR, aussi connu sous le nom de mégacôlon aganglionnaire, traité avec le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF - glial-derived neurotrophic factor), des données suggèrent que les PCS se différencient en CGE dans ce contexte (Soret *et al.*, 2020)

Plusieurs processus interviennent lors de la colonisation des CCNE, tels que l'équilibre entre la prolifération des précurseurs et leur différenciation en neurones et en CGE, la survie cellulaire ou encore la migration. La coordination de ces processus est finement régulée par plusieurs voies de signalisation. Une dérégulation des réseaux moléculaires impliqués résulte ultimement en l'apparition de pathologies regroupées sous le terme de neurocristopathies (qui seront abordées dans la troisième partie de ce chapitre), dont HSCR (Nagy et Goldstein, 2017). Parmi ces régulateurs, la voie RET/GDNF régule la prolifération (Liu, P. *et al.*, 2009), la survie (Mograbi *et al.*, 2001) et la migration (Guo *et al.*, 2006) des CCNE. La signalisation EDNRB/ET-3 (récepteur B à l'endotheline - endothelin receptor B/endotheline-3 - endothelin-3) stimule la prolifération des CCNE et inhibe leur différenciation neuronale précoce (Nagy et Goldstein, 2006). Ces deux voies de signalisation sont centrales dans le développement du SNE. De plus, des facteurs de transcription jouent également un rôle essentiel. SOX10, exprimé par les CCN au moment de leur migration, est indispensable à la survie des CCNE (Kapur, 1999) et pour le maintien d'un pool de cellules prolifératif et indifférencié (Bondurand *et al.*, 2006; Paratore *et al.*, 2002). PHOX2B promeut également la survie, la prolifération des CCNE, et la neurogenèse (Pattyn *et al.*, 1999). ASCL1 (Facteur de transcription BHLH de la famille Achaete-Scute 1 - Achaete-Scute family BHLH transcription factor 1) et HAND2 (Protéine 2 exprimée par les dérivés du cœur et de la crête neurale - Heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2) sont quant à eux impliqués dans la différenciation neuronale (D'Autréaux *et al.*, 2007; Memic *et al.*, 2016). D'autres facteurs comme les protéines osseuses morphogénétiques (BMP – Bone morphogenic protein)

BMP2 et BMP4 ont également des effets pléiotropiques sur les CCNE en régulant leur migration (Fu *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2005) et leur différenciation en neurones ou en CGE (Chalazonitis *et al.*, 2011; Chalazonitis *et al.*, 2008). Additionnellement à ces voies de signalisation, le mésenchyme intestinal et les CCNE sécrètent et interagissent avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, qui régulent la formation du SNE. À titre d'exemple, il a été démontré que la surexpression du gène *Col6a4* codant pour le collagène 6α4 par les CCNE (induisant ainsi une augmentation du collagène IV dans la matrice extracellulaire), a pour conséquence une diminution de la migration des CCNE et ainsi la formation d'un mégacôlon aganglionnaire (Soret *et al.*, 2015).

Ainsi, la colonisation du tractus digestif par les CCN et les PCS repose sur des mécanismes spatiotemporels complexes, finement régulés par des signaux extracellulaires et des réseaux génétiques intrinsèques. La section suivante donne un aperçu de la différenciation de ces précurseurs.

1.1.2.3 Différenciation des progéniteurs

Lors de la colonisation de l'intestin, les CCNE doivent conserver un équilibre entre le maintien du pool de progéniteurs prolifératifs indifférenciés et leur différenciation en neurones et en CGE (Rao et Gershon, 2018). Deux processus débutent successivement en se chevauchant : la neurogenèse, puis la gliogenèse entérique. Les progéniteurs neuronaux PGP9.5+ (Produit génétique protéique 9.5 - Protein gene product 9.5) sont détectables dès E10-10.5 et les progéniteurs gliaux B-FABP+ (Protéine de liaison des acides gras du cerveau - Brain fatty acid-binding protein) dès E11.5-E12.5 (Young *et al.*, 2003). Les CCNE ont ainsi un destin cellulaire double, mais les mécanismes sous-jacents à l'acquisition de ce destin sont encore peu connus (Charrier et Pilon, 2017; Lefevre *et al.*, 2023). Elles sont très probablement régulées par la combinaison de facteurs intrinsèques et des signaux du microenvironnement cellulaire auxquels est exposé le front de migration des CCNE, ce qui induit ainsi leur spécification et leur différenciation (Zhou *et al.*, 2024).

Parmi les facteurs intrinsèques, le facteur de transcription SOX10 exerce un rôle pro survie des CCNE, maintient leur multipotence et induit l'expression de PHOX2B et ASCL1. L'équilibre entre l'expression de SOX10 et PHOX2B est également déterminant pour le destin cellulaire. Quand l'expression de PHOX2B est réprimée et celle de SOX10 maintenue, les CCNE acquièrent un destin glial, à l'inverse, une forte expression de PHOX2B et une faible expression de SOX10 favorise le destin neuronal (Kim *et al.*, 2003; Paratore *et al.*, 2001). Une analyse des régions ganglionnaires d'un modèle murin *Sox10^{Dom/+}* a révélé une altération des proportions globales de neurones et CGE (dont le ratio neurone:glie), ainsi que des sous-types neuronaux. Ces observations soulignent le rôle central de SOX10 dans l'engagement des CCNE dans ces

deux lignées cellulaires (Musser *et al.*, 2015). Les voies Notch et Hedgehog sont également impliqués dans l’acquisition du destin cellulaire et ont été largement décrites par Charrier et al. (Charrier et Pilon, 2017).

Plus récemment, l’utilisation du séquençage ARN de cellules uniques (scRNA-seq – *Single cell RNA-sequencing*) a constitué une opportunité majeure pour étudier le développement du SNE, et apporter de nouvelles connaissances sur le destin cellulaire des CCNE (Li et Ngan, 2022). En réanalysant et complétant de précédentes données de scRNA-seq (Cao *et al.*, 2019) à partir d’embryons de souris entre E9.5 et E16.5, le gène *Ezh2* (Enhancer of zeste homolog 2) codant pour une protéine modifiant les histones (Kim *et al.*, 2018) et connu pour contrôler le destin cellulaire neuronal/astrocytaire dans le SNC (Neo *et al.*, 2014), a été mis en évidence comme gène candidat dans l’acquisition du destin cellulaire. À tous les stades entre E9.5 et E16.5, *Ezh2* est en effet surexprimé dans les progéniteurs gliaux, et les gènes impliqués dans la gliogenèse entérique sont enrichis chez ces cellules. En revanche, *Ezh2* est sous-exprimé dans les progéniteurs neuronaux présentant un enrichissement en gènes impliqués dans la neurogenèse (Lai *et al.*, 2021). Une autre étude de Lasrado et al. analysant des intestins embryonnaires de souris *Sox10::CreERT2;Rosa26tdTomato* à E12.2-E13, a cherché à identifier les signatures transcriptionnelles et les régulateurs moléculaires des différents types de précurseurs du SNE. Des marqueurs moléculaires étaient associés aux différentes trajectoires développementales, dont *Tubb3* pour la trajectoire neurogénique et *Erbb3* pour la trajectoire gliogénique. L’expression de ces gènes était corrélée respectivement avec des gènes de la neurogenèse et la gliogenèse entérique. Additionnellement, cette étude a identifié la signalisation RET comme essentielle dans l’acquisition d’un destin neuronal par les précurseurs bipotents (Lasrado *et al.*, 2017). Bien que de nombreuses autres études utilisant le scRNA-seq aient identifié de potentielles voies impliquées dans l’acquisition d’une identité gliale ou neuronale, la majorité de ces résultats restent encore à valider *in vivo* (Li et Ngan, 2022). Ainsi, les mécanismes moléculaires exacts impliqués dans la transition du destin neurogénique vers gliogénique, demeurent largement méconnus, et peu d’avancées ont été réalisées ces dernières années. L’utilisation du scRNA-seq à différents stades embryonnaires représente néanmoins une approche prometteuse pour de futures découvertes.

La différenciation neuronale commence de façon presque immédiate au début de la colonisation. Le début de ce processus est marqué par l’expression de marqueurs neuronaux comme TUBB3/TUJ1 et HuC/HuD (Hao *et al.*, 2009). La naissance des neurones est asynchrone. Les premiers à apparaître sont sérotoninergiques (E9 à E15), puis cholinergiques (E14 à E17). Enfin les dopaminergiques, peptidergiques, nitrergiques et GABAergiques se forment majoritairement à E14 dans le plexus myentérique, puis vers P0 et jusqu’à deux semaines dans le plexus sous-muqueux (Pham *et al.*, 1991). Différents signaux et régulateurs génétiques sont impliqués dans la formation de ces neurones. À titre d’exemple, la délétion de *Hand2* dans

un modèle murin résulte en des déficits structuraux du SNE, une réduction de la densité neuronale et provoque une altération de la formation de certains sous-types neuronaux (Hendershot *et al.*, 2007). D'autres régulateurs sont également impliqués dans la spécification neuronale comme la neurotrophin-3, les BMP, ASCL1 (Lake et Heuckeroth, 2013). Concernant la gliogenèse entérique, une section lui sera entièrement consacrée dans la partie de ce chapitre traitant des CGE.

Cependant, la mise en place du SNE ne repose pas uniquement sur l'acquisition progressive de l'identité cellulaire neuronale ou gliale. Elle implique également une organisation spatiale complexe en réseaux nerveux. Celle-ci est acquise lors de la morphogenèse et de la maturation postnatale qui seront présentées dans les sections suivantes.

1.1.2.4 Morphogenèse et gangliogenèse du système nerveux entérique

Les CCNE en cours de différenciation s'organisent pour former premièrement les ganglions du PM, puis secondairement du PSM. Ces plexus présentent des morphologies dissemblables qui sont probablement le reflet de l'interaction des CCNE avec des microenvironnements cellulaires et moléculaires très différents, ainsi que de processus développementaux distincts. Cependant, les connaissances sur les mécanismes sous-jacents à la morphogenèse entérique sont encore limitées, particulièrement concernant la formation du PSM qui est souvent exclu des analyses. En raison de leur interconnexion, l'analyse des deux plexus est nécessaire pour obtenir une vision complète et intégrée de la physiologie et du fonctionnement du SNE.

Pour mieux comprendre la formation des plexus, Lasrado et al. ont utilisé un système de traçage cellulaire *Sox10::CreER^{T2}* induit au tamoxifène à E12.5, associé à un système rapporteur *Confetti*, permettant de marquer d'une couleur unique la descendance clonale d'une cellule précurseur. Grâce à ce système génétique, ils ont décrit la distribution clonale de différents types de progéniteurs : bipotents, restreints à un destin glial et restreint à un destin neuronal. Le PM est ainsi formé de cellules fondatrices qui prolifèrent localement et forment des domaines topologiques se chevauchant. De plus, les cellules dérivant de ces progéniteurs se distribuent sur l'axe radial de la muqueuse intestinale. Les clones des progéniteurs neurogéniques restent localisés dans le PM, mais les clones bipotents et gliogéniques forment le PSM et envahissent la muqueuse. Ces résultats suggèrent que le PSM dérive secondairement de progéniteurs du PM (Lasrado *et al.*, 2017), et que la différenciation de ces précurseurs se fait de façon radiale comme dans le cortex cérébral (Cortay *et al.*, 2020).

Concernant la formation du PSM, une voie identifiée comme impliquée dans ce processus est celle des nétrines/DCC (Deleted in Colorectal Cancer – supprimé dans le cancer colorectal). Les nétrines sont des

protéines chemoattractantes apparentées aux laminines, sécrétées par l'épithélium intestinal, qui se lient aux récepteurs DCC exprimés par les CCNE (Jiang *et al.*, 2003). À E15.5, en condition physiologique, le PSM commence à se former dans le petit intestin. Toutefois, il est totalement absent chez les souris *Dcc*^{-/-} et ne se développe pas après la naissance (Jiang *et al.*, 2003), démontrant ainsi le rôle central de cette voie dans la formation du PSM.

Plusieurs morphogènes sont également impliqués dans la morphogenèse du SNE. C'est le cas de la voie Hedgehog, dont les ligands Sonic Hedgehog (SHH) et Indian Hedgehog (IHH) sont exprimés par l'épithélium intestinal lors du développement embryonnaire. Ils participent au développement concentrique de l'intestin et du SNE (Ramalho-Santos *et al.*, 2000; Sukegawa *et al.*, 2000). Des mutations ou délétions de *Shh* et *Ihh*, entraînent respectivement une colonisation et une différenciation anormale des CCNE dans la muqueuse, et une aganglionose partielle de l'intestin (Ramalho-Santos *et al.*, 2000). Par ailleurs, la signalisation Hedgehog induit la sécrétion de BMP2 et BMP4 par le mésenchyme adjacent à l'épithélium intestinal (Goldstein *et al.*, 2005; Lake et Heuckeroth, 2013). L'effet chemoattractant de BMP4 sur les CCNE est alors régulé négativement par la sécrétion de Noggin dans la muqueuse, ce qui restreint topologiquement la colonisation des CCNE dans la partie externe de la paroi intestinale et empêche un développement ectopique dans la muqueuse (Fu *et al.*, 2006; Goldstein *et al.*, 2005). Les BMP sont également impliqués dans la gangliogenèse en modulant les molécules d'adhésion cellulaire et agissent de concert avec la voie Hedgehog, en modifiant l'interaction des CCNE à la matrice extracellulaire dont la composition évolue au cours du développement (Hackett-Jones *et al.*, 2011; Nagy *et al.*, 2016; Newgreen *et al.*, 2013). Par exemple, dans des cultures de CCNE in vitro et des explants intestinaux, BMP4 induit la polysialylation de NCAM (Neural cell adhesion molecule - Molécule d'adhésion des cellules neurales), une molécule d'adhésion cellulaire exprimée par les neurones, les CGE et leurs précurseurs, ce qui stimule l'agrégation des cellules neuronales en ganglions (Chalazonitis et Kessler, 2012; Faure *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2006). D'autres molécules d'adhésion comme la β -intégrine et la N-cadhéchine sont également impliquées dans ce processus de gangliogenèse (Breau *et al.*, 2006; Broders-Bondon *et al.*, 2012).

De façon complémentaire aux approches de biologie moléculaire et cellulaire, des méthodes mathématiques et computationnelles ont été utilisées pour modéliser les processus impliqués dans la morphogenèse du SNE. L'intégration de données expérimentales sur la migration, la prolifération et la différenciation des CCN dans des modèles mathématiques prédictifs a permis de mieux comprendre l'organisation du SNE, ainsi que ses perturbations dans le contexte pathologique d'HSCR (Newgreen *et al.*, 2013). Plus récemment, Shemonti et al. ont modélisé l'architecture et la connectivité du SNE murin à partir de données de microscopie confocale. Ce type de modélisation ouvre d'intéressantes perspectives en tant qu'outil diagnostic des

pathologies du SNE chez l'humain, complémentaire aux techniques actuelles des anatomopathologistes (évaluation manuelle par microscopie des échantillons, immunomarquages) (Shemonti *et al.*, 2022).

1.1.2.5 Développement et maturation postnatale du système nerveux entérique

Le développement du SNE ne se limite pas à la période embryonnaire, mais se poursuit après la naissance, pendant une période cruciale pour l'acquisition de la fonctionnalité complète de l'intestin. Durant cette période postnatale, le SNE continue de se développer et de maturer sous l'influence de mécanismes intrinsèques et de facteurs extrinsèques (Foong, 2016).

Tout d'abord les plexus subissent d'importants remodelages architecturaux, concomitants à la croissance du GI (de Vries *et al.*, 2010). Le réseau formé par le PM, très dense à la naissance dans le petit et gros intestin, s'étend et se dédensifie au cours des jours suivants. Des observations réalisées chez le rat et l'humain montrent que lors de la période postnatale précoce, le soma des neurones augmente et la densité neuronale des zones ganglionnaires diminue au cours du temps (de Vries *et al.*, 2010; Schäfer *et al.*, 1999; Wester *et al.*, 1999). Chez la souris à P (jour postnatal) 0.5, de rares neurones sont observables dans le PSM de la partie proximale de l'intestin, certains projetant des prolongements vers le PM déjà bien formé. Ces cellules commencent à s'agrégner vers P3 pour former des ganglions. Le nombre de neurones augmente ensuite progressivement, et les ganglions atteignent leur taille définitive dès P28, dans les parties proximales et distales du côlon (McKeown *et al.*, 2001). La temporalité de cette maturation coïncide avec la période de sevrage, au cours de laquelle le PSM doit être suffisamment fonctionnel pour assurer la régulation de la sécrétion et l'absorption des nutriments. C'est donc pendant cette phase, lorsque les neurones s'agrègent et que les connexions interganglionnaires s'établissent, que le SNE et l'intestin acquièrent leur maturité définitive. Enfin, bien que les PCS commencent à envahir le mésenchyme intestinal dès le développement embryonnaire, ils contribuent également au pool de progéniteurs qui se différencieront en neurones au cours de la période postnatale (Uesaka *et al.*, 2015).

Les fonctions intestinales nécessitent également la maturation du SNE. Par exemple, la motilité intestinale s'acquierte en plusieurs étapes au cours du développement embryonnaire et postnatal. À partir du stade embryonnaire E13.5, les premiers mouvements intestinaux sont observés dans le duodénum (Roberts *et al.*, 2010). Cette motilité n'est pas médiée par les neurones ou les cellules interstitielles de Cajal, mais est d'origine myogénique. En effet, bien qu'une activité électrique est observable dès E11.5, au début de la différenciation neuronale, la synaptogenèse demeure encore incomplète (Hao *et al.*, 2012). Ce n'est qu'à E18.5, juste avant la naissance, que la motilité est régulée localement par les neurones du SNE dans cette région (Roberts *et al.*, 2010). Lors du développement postnatal, la motilité continue sa maturation. Des

mesures du transit colique chez le rat, via le test de la bille, ont montré une diminution du temps d’expulsion entre P14 et P21, traduisant une augmentation de l’activité du transit intestinal. Il y a une acquisition progressive de la motilité des muscles longitudinaux du côlon, indétectable dès P3 puis complète à P36 (de Vries *et al.*, 2010). La maturation de la motilité se fait parallèlement à celle des neurones, qui subissent des changements dans leur composition neurochimique jusqu’au sevrage. Dans la même étude, la quantification des neurones cholinergiques et nitrergiques dans le PM a révélé une augmentation concomitante de l’activité musculaire avec les proportions de neurones excitateurs ChAT+ entre P1 et P36, et des neurones inhibiteurs nNOS+ entre P1 et P5. Des changements neurochimiques sont également observables dans le PSM mais de façon retardée par rapport au PM (Parathan *et al.*, 2020). De plus, les neurones subissent d’autres modifications phénotypiques pendant cette période comme au niveau de leur électrophysiologie, leur synaptogenèse et leur morphologie (Foong, 2016; Foong *et al.*, 2012). Quant à la maturation gliale, qui sera abordée dans la prochaine partie, elle est bien moins décrite dans la littérature et demeure encore à explorer (Cossais *et al.*, 2016). Ainsi, il apparaît que le SNE est encore immature à la naissance, nécessitant une phase de maturation postnatale cruciale pour atteindre sa pleine fonctionnalité.

Des facteurs environnementaux tels que la diète, le microbiote et le système immunitaire jouent également un rôle prépondérant dans la maturation postnatale du SNE (Foong *et al.*, 2020; Joly *et al.*, 2021). Durant l’embryogenèse, le SNE se développe dans un environnement globalement stérile. Cependant, au moment de la naissance, l’intestin est colonisé initialement par le microbiote vaginal de la mère, qui évoluera pendant la période pré-sevrage avant d’acquérir sa composition adulte (Kabouridis et Pachnis, 2015). Chez des souris dépourvues de microbiote, dites « germ-free », le développement du SNE est altéré. Dès P3, des anomalies sont observables dans le PM du jéjunum et de l’iléon dont : la diminution du nombre de neurones par ganglion, une augmentation des proportions de neurones nitrergiques et un ralentissement de la motilité intestinale (Collins *et al.*, 2014). De même, des traitements aux antibiotiques induisant une dysbiose du microbiote intestinal chez les souriceaux, entraînent des perturbations de la motilité, de l’activité et du phénotype neurochimique des neurones entériques (Caputi *et al.*, 2017; Hung *et al.*, 2019). Ces effets liés à l’absence de microbiote demeurent cependant réversibles : la recolonisation de souris germ-free par le microbiote de souris conventionnelles restaure les fonctions du SNE (McVey Neufeld *et al.*, 2015). Quant au système immunitaire, un article récent a démontré que les macrophages résidents de la couche musculaire externe, sont impliqués dans le remodelage postnatal du SNE, en éliminant les synapses excédantes et en phagocytant des neurones. Leur déplétion résulte en un transit intestinal anormal (Viola *et al.*, 2023). Toutefois, les données concernant le rôle des autres cellules immunitaires dans cette période demeurent limitées et nécessitent des investigations supplémentaires.

Cette première partie avait pour visée de décrire les généralités sur le SNE, ses fonctions, ainsi que son développement, depuis la colonisation des CCN jusqu'à la période postnatale. Quand il s'agit d'étudier le SNE, les travaux de recherches se concentrent quasi exclusivement à la population neuronale. Pourtant, les CGE constituent également des acteurs majeurs de ce système. Dans cette partie, de nombreux détails les concernant ont été omis, qui seront détaillés dans la partie suivante qui leur est entièrement consacrée.

1.2 Les cellules gliales entériques

1.2.1 Historique des cellules gliales entériques

La première observation historique des cellules gliales dans l'intestin a été réalisée par Dogiel en 1899 (Dogiel et Dogiel). Cependant, en raison des limites des technologies de marquage et de microscopie de l'époque, ces cellules furent longtemps assimilées à des cellules de Schwann et restèrent peu étudiées (Gulbransen, 2014). Ce n'est qu'au cours des années 1970, grâce aux avancées permises par la microscopie électronique, que Gabella mit en évidence l'importante abondance des cellules gliales dans la paroi intestinale par rapport aux neurones, ainsi que leur morphologie et leur structure subcellulaire. Contrairement aux neurones entériques (au corps cellulaire large et au noyau rond central), les CGE présentent un noyau ovoïde logé dans un petit corps cellulaire allongé, duquel émergent de multiples prolongements de tailles et formes variées. En raison de leur structure stellaire commune et de leur morphologie générale, il assimile alors la glie intestinale aux astrocytes du SNC (Gabella, 1971, 1972). En 1981, c'est dans un article entièrement consacré à ces cellules, qu'il utilise pour la première fois la dénomination « cellules gliales entériques » (Gabella, 1981). La comparaison des CGE avec les astrocytes est renforcée dans les années 1980, avec l'analyse des marqueurs moléculaires communs aux deux populations cellulaires chez le cochon d'inde. Lors du développement, ces populations expriment la Vimentine (Jessen et Mirsky, 1983), puis dans l'intestin adulte GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Jessen et Mirsky, 1980). Toutefois, elles présentent également des dissemblances. Les astrocytes proviennent du tube neural (Molofsky et Deneen, 2015), contrairement aux CGE qui proviennent de la crête neurale. De même, les CGE n'expriment pas le marqueur astrocytaire ALDH1L1 (aldehyde dehydrogenase 1 family member L1) (Boesmans *et al.*, 2014). Une autre publication comparant le transcriptome de plusieurs populations gliales du SNP et du SNC avec celui des CGE, a déterminé que ces dernières présentaient un transcriptome distinct des autres types de cellules gliales. Il est intéressant de constater que leur transcriptome se rapproche le plus de celui des cellules de Schwann et des oligodendrocytes, mais comporte des similarités plus limitées avec les astrocytes. Ces observations démontrent que les CGE constituent une population à part entière, parmi la diversité de populations gliales dans le système nerveux et qu'elle est distincte des astrocytes (Rao *et al.*, 2015). Plus récemment encore, Scavuzzo et al. ont établi des différences transcriptionnelles supplémentaires entre les CGE et les glies du SNC, et rapproche transcriptionnellement

les CGE des cellules épendymaires et des tanocytes (cellules épendymaires de l'hypothalamus) (Scavuzzo *et al.*, 2023).

Le mot « glie » est étymologiquement dérivé de mot grec « $\gamma\lambdaοι$ » qui signifie « glue » ou colle. Historiquement, les cellules gliales étaient considérées comme la « colle » du système nerveux, c'est-à-dire des cellules de support structurel aux fonctions limitées. Elles demeurent cependant très abondantes dans le SNE, avec un ratio CGE:neurones variable selon les espèces et les plexus, mais par exemple élevé dans le PM et le PSM de l'humain (Gabella et Trigg, 1984; Gulbransen, 2014; Hoff *et al.*, 2008). Ces données soulèvent la question suivante : ces cellules n'auraient-elles pas des fonctions plus importantes, ce qui justifierait ainsi leur abondance par rapport aux neurones dans le système nerveux ? Et en effet, un changement de paradigme s'est opéré au cours des 25 dernières années, pendant lesquelles se sont produites de nombreuses découvertes mettant en évidence le rôle central des CGE dans la physiologie du SNE et du GI, ainsi que dans la physiopathologie de maladies digestives et extra-digestives. Les prochaines sous-parties seront consacrées à démontrer en quoi les CGE présentent une grande complexité sur le plan développemental, mais aussi en ce qui concerne leur diversité, leur hétérogénéité et leurs fonctions.

1.2.2 Développement des cellules gliales entériques

1.2.2.1 Différenciation séquentielle des progéniteurs en cellules gliales entériques

Comme indiqué précédemment, lors du développement embryonnaire du SNE, les CGE dérivent des CCN, tout comme les neurones. De même, les PCS constituent une source potentielle de ces cellules, bien que leur implication n'ait pas encore été formellement démontrée. Dans le contexte d'une thérapie régénérative du SNE basée sur l'utilisation du GDNF, ces précurseurs contribuent à la formation de neurones et de CGE de novo (Soret *et al.*, 2020). Cependant, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour établir si les PCS contribuent à la gliogenèse en conditions physiologiques, et pour préciser quelle est l'ampleur de cette contribution par rapport à celle des CCN.

La gliogenèse entérique débute à E11.5-E12.5 au cours de la colonisation du mésenchyme intestinal par les CCN. À ce stade, les précurseurs entériques qui se sont engagés dans un lignage de différenciation gliale, maintiennent l'expression de SOX10 et commencent à exprimer le marqueur glial précoce FABP-7 (Young *et al.*, 2003). Cette protéine est impliquée dans l'absorption, le transport, le métabolisme et le stockage des acides gras. Dans le SNC elle est connue pour réguler l'établissement des neurones corticaux et la neurogenèse néonatale (George Warren *et al.*, 2024). Il convient de noter qu'aucune évidence ne suggère un rôle éventuel de cette protéine dans le processus d'acquisition du destin glial ou dans la gliogenèse entérique. Cette affirmation restera vraie pour l'ensemble des marqueurs gliaux qui seront évoqués ensuite

dans cette sous-partie. Après FABP7, d'autres marqueurs moléculaires gliaux font leur apparition de manière séquentielle (Figure 1.7). Dans une temporalité proche, la protéine protéolipide 1 (PLP1 – proteolipid protein 1) devient détectable (Patyal *et al.*, 2023). Exprimée par les cellules myélinisantes du SNC et du SNP (respectivement, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann), PLP1 est la protéine la plus abondante de la myéline (Wight, 2017). À E14.5, la protéine de liaison au calcium S100 β (S100 β - S100 calcium-binding protein β) est à son tour à être exprimée (Michetti *et al.*, 2023; Young *et al.*, 2003). Elle intervient notamment dans la différenciation et la maturation des astrocytes et des oligodendrocytes du SNC (Hernández-Ortega *et al.*, 2024). Puis, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP - Glial Fibrillary Acidic Protein) est exprimée dès E16.5 (Rothman *et al.*, 1986). Il s'agit d'une protéine appartenant à la famille des filaments intermédiaires, conférant structure et force mécanique aux cellules gliales, ainsi que du support aux neurones et à la barrière hémato-encéphalique du SNC (Yang et Wang, 2015). Ces marqueurs ont été associés à différents niveaux de différenciation des CGE. Toutefois, la compréhension des états différenciés au cours du développement embryonnaire reste limitée (Figure 1.7). Enfin, la voie de différenciation des CCNE en CGE décrite ici, ne reflète en rien l'importante hétérogénéité gliale observable à l'âge adulte (Boesmans *et al.*, 2015).

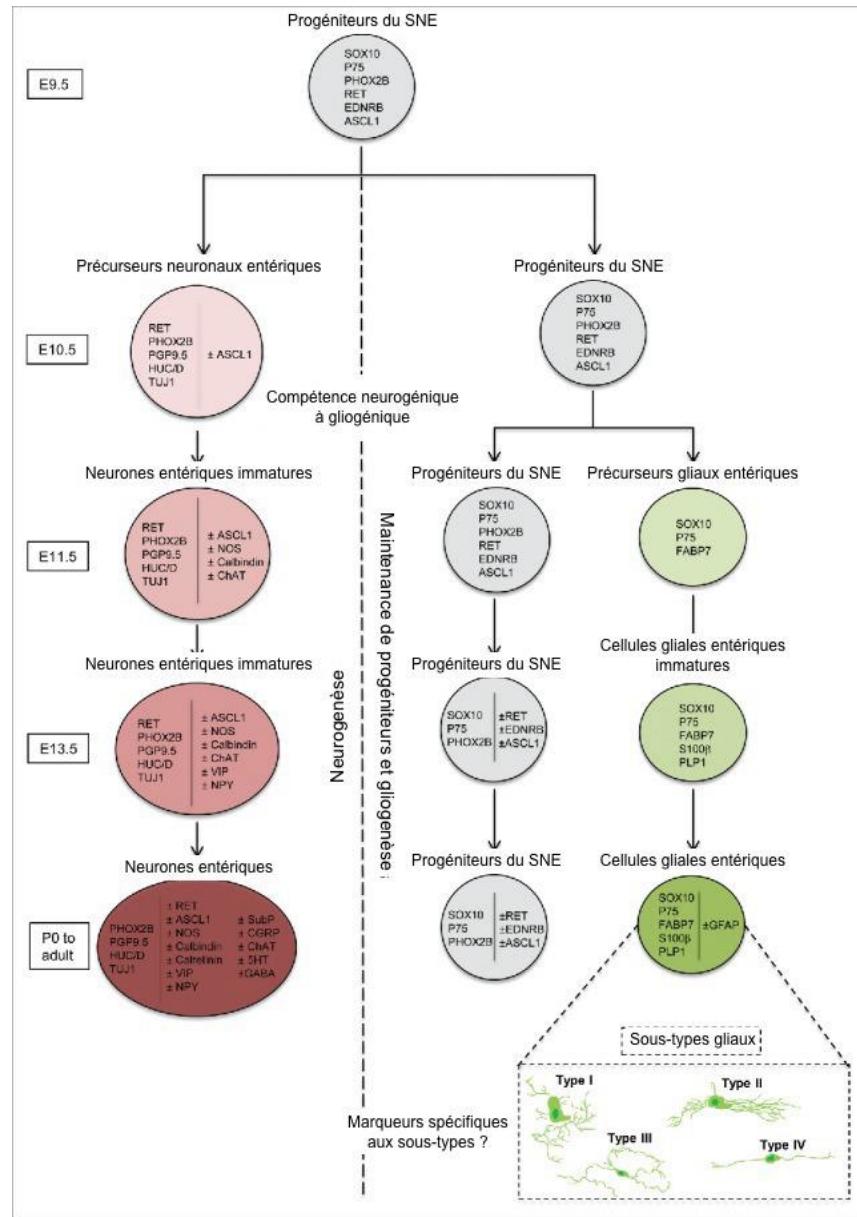


Figure 1.7 : Marqueurs spécifiques clés lors de la formation du SNE

Représentation des neurones et CGE en cours de différenciation, ainsi que de la temporalité d'expression des différents marqueurs moléculaires. Parmi l'ensemble des progéniteurs, une partie se différencie en neurone et CGE, alors qu'une autre est maintenue dans un état indifférencié et prolifératif. Il doit être noté que PLP1 et FABP7 commencent à être exprimés à E12.5 et S100 β à E14.5 ; la représentation des CGE immature à E13.5 simplifie cette temporalité d'apparition. Les sous-types gliaux seront explicités dans une section dédiée. Adapté de (Charrier et Pilon, 2017)

1.2.2.2 Régulateurs génétiques impliqués dans la gliogenèse entérique embryonnaire

Bien que les processus sous-jacents à la gliogenèse entérique demeurent encore peu connus, certains régulateurs génétiques — facteurs de transcription et voies de signalisation — ont été identifiés (Lefevre *et al.*, 2023). Tout d'abord, SOX10 est un facteur de transcription clé dont l'altération impacte la différenciation et l'acquisition du destin glial. Dans un contexte d'haploinsuffisance de SOX10, les CCNE issues d'embryons *Sox10^{lacZ}* expriment majoritairement le marqueur neuronal PGP9.5. Cela traduit une différenciation préférentiellement orientée vers un destin neuronal au détriment de la lignée gliale (Paratore *et al.*, 2002). Dans un modèle murin mutant pour l'inhibiteur SUFU des facteurs de transcription GLI (voie de signalisation Hedgehog) et haploinsuffisant pour SOX10 (*Wnt1-Cre;Sufu^{ff};Sox10^{N/+}*), la diminution du niveau d'expression de SOX10 réduit significativement l'expression de FABP7 dans l'intestin à E12.5 (Liu *et al.*, 2015). Outre son rôle dans la morphogenèse du SNE, la voie Hedgehog participe également à la gliogenèse. Les CCNE expriment le récepteur PATCHED-1 (PTCH1) qui inhibe constitutivement la protéine transmembranaire SMOOTHENED (SMO). Elles expriment également les effecteurs nucléaires GLI, activés lorsque l'inhibition de PTCH1 sur SMO est levée, après liaison de SMO à ses ligands SHH ou IHH sécrétés par l'épithélium intestinal (Bitgood et McMahon, 1995; Echelard *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2004). Dans le même modèle d'embryon *Wnt1-Cre;Sufu^{ff}* à E12.5, l'augmentation de l'activité des GLI par la levée de l'inhibition de SUFU induit une expression robuste de FABP7 dans l'intestin. À E13.5, le ratio neurone:glie diminue dans les mutants *Sufu*. De plus, les facteurs de transcription GLI2 et GLI3 agissent comme des activateurs (GLI2^A) ou des inhibiteurs (GLI3^R). Dans un mutant GLI3^{Δ699/Δ699} produisant constitutivement la forme répresseur, l'intestin contient significativement moins de CGE FABP7+. Cela démontre de l'importance du ratio GLI2^A/ GLI3^R dans l'acquisition du destin glial ou neuronal des CCNE (Liu *et al.*, 2015). In vitro, la délétion de *Ptch1* dans les CCNE induit une gliogenèse spontanée. In vivo, la délétion de *Ptch1* spécifiquement dans les CCN vagales chez les embryons mutants *b3-IIIa-Cre,Ptch1^{ff}* induit une augmentation du signal FABP7 dans l'intestin à E12.5 (Ngan *et al.*, 2011). Ainsi, l'activation de la voie Hedgehog stimule la gliogenèse entérique au détriment de la neurogenèse.

D'autres facteurs de transcription ont été également identifiés dans ce processus. ASCL1 (ou MASH1), est exprimé par les CCNE, les neurones et les CGE. Dans des embryons *Ascl1^{-/-}*, en plus d'une neurogenèse altérée, une diminution de CGE SOX10+ S100β+ a été observé dans l'iléon et le côlon. Le sauvetage de la neurogenèse par l'utilisation du mutant *Ascl1^(KINgn2)* - dans lequel le gène *Ngn2* à l'activité pro-neurale remplace *Ascl1* - ne permet pas de restaurer la gliogenèse, ce qui indique la fonction pro-gliale d'ASCL1 (Memic *et al.*, 2016). FOXD3, un autre facteur de transcription, exprimé par les progéniteurs du SNE et les CGE, joue également un rôle important dans la gliogenèse. Sa délétion spécifique dans les précurseurs dérivés des CCN vagales exprimant EDNRB (Récepteur B à l'endothéline - Endothelin Receptor B) altère

la formation des CGE S100 β + dans le duodénum et le côlon lors du développement embryonnaire. Cet effet persiste chez l'adulte (Mundell *et al.*, 2012). TBX3 est exprimé dans les CCN, les CCNE et les neurones, mais pas dans les CGE. Sa délétion dans les CCN provoque une diminution de la densité de CGE S100 β + dans le petit intestin des embryons et sourceaux *Wnt1-Cre;Tbx3^{fl/fl}*. Ces résultats suggèrent que TBX3 est nécessaire à la différenciation des CGE mais que son effet est probablement non cellule-autonome (López *et al.*, 2018). Enfin, le plus récent régulateur à avoir été identifié est le facteur de transcription NR2F1 (membre 1 de la sous-famille des récepteurs nucléaires). Exprimé par les CCN et les PCS lors du développement embryonnaire, sa surexpression dans les CCN mène à une formation prématuée des CGE SOX10+ S100 β +, ce qui a pour conséquence la formation d'un mégacôlon embryonnaire chez les sourceaux *Nr2f1^{Spt/Spt}* (Bergeron *et al.*, 2016). Quant aux PCS, cette surexpression induit une altération du destin PCS/mélanoblaste dans cette lignée (Bonnamour *et al.*, 2022). Ce régulateur ainsi que le modèle murin *Nr2f1^{Spt/Spt}* feront l'objet d'une partie dédiée dans ce chapitre d'introduction.

D'autres voies de signalisation ont été également identifiées comme impliquées dans la gliogenèse entérique. Notamment, la voie Notch joue un rôle clé dans la décision du destin cellulaire des progéniteurs du SNC et du SNP. Les CCN et les progéniteurs du SNE expriment de multiples récepteurs Notch ainsi que leurs ligands DLL/JAG (Mead et Yutzey, 2012; Okamura et Saga, 2008; Williams *et al.*, 1995). Une délétion conditionnelle de *Rbpsuh*, codant la protéine de liaison à l'ADN RBP/J qui interagit avec le domaine intracellulaire du récepteur Notch quand il est activé, dans les CCN WNT1+, résulte en une importante diminution de CGE FABP7+ dans les embryons *Wnt1-Cre;Rbpsuh^{fl/fl}* dès E14.5. Une réduction du nombre de CCNE et des neurones a été également observée chez les embryons, indiquant le rôle de cette voie dans la maintenance des précurseurs, ainsi que dans leur différenciation (Taylor *et al.*, 2007). De plus, la voie Notch agit de concert avec la voie Hedgehog pour induire la gliogenèse. En effet, le traitement de progéniteurs du SNE avec le ligand DLL1 ou SHH induit la formation de CGE GFAP+, alors que l'inhibition de la signalisation Notch lors de ces traitements abolit l'induction de la gliogenèse entérique médiée par la voie Hedgehog (Ngan *et al.*, 2011). LGI4/ADAM22 (A desintegrin and metaloproteinase 22) est une autre voie de signalisation impliquée dans la gliogenèse. Le ligand LGI4 et son récepteur ADAM22 sont notamment exprimés par les progéniteurs du SNE et les CGE lors du développement. Chez les souris déficientes en LGI4 ou ADAM22, la gliogenèse entérique est altérée ce qui a pour conséquence une diminution du nombre de CGE FABP7+ chez les embryons et une altération de l'acquisition de leur morphologie à P0. Cette voie intervient également dans la prolifération des progéniteurs engagés dans un destin glial (Nishino *et al.*, 2010). Dans le SNP, la voie NRG (Neuregulin)/ERBB est également impliquée dans la gliogenèse. Les CCNE et CGE expriment le récepteur ERBB3, tandis que le mésenchyme intestinal sécrète le ligand GGF2 (ou NRG1) (Chalazonitis *et al.*, 2011; Jardé *et al.*, 2020; Meyer et Birchmeier, 1995).

Les souris déficientes en ERBB3 présentent une déficience totale en CGE S100 β + (Riethmacher *et al.*, 1997). In vitro, le traitement des CCNE avec GGF2 stimule leur différenciation en CGE GFAP+, ainsi que la prolifération gliale. Cette signalisation GGF2/ERBB3 est médiée par BMP4 qui promeut l'expression d'ERBB3 par les CCNE. Une préexposition des CCNE à BMP4 amplifie l'effet pro-gliogénique du traitement GGF2 (Chalazonitis *et al.*, 2011).

Même si les avancées technologiques actuelles permettent d'identifier plus aisément les réseaux de régulation génétique impliqués dans des processus développementaux, aucun article très récent ne rapporte la découverte de nouveaux régulateurs de la gliogenèse entérique. Le candidat le plus récent est le marqueur glial PLP1. Toutefois, l'analyse morphologiques du SNE des souris *Plp1 null* (déficiente pour *Plp1*), n'a pas permis de mettre en évidence d'altérations notables. Au contraire, les quantifications gliales réalisées dans le PM de l'iléon distal et du côlon proximal de ces souris ne présentaient pas de différences significatives (Woods *et al.*, 2023). Étudier ces régulateurs s'avère particulièrement complexe. En effet, de nombreux régulateurs pro-gliaux sont également exprimés dans les progéniteurs du SNE. Cela complique les expériences perte-de-fonction, qui peuvent entraîner l'élimination précoce des progéniteurs, avant même de pouvoir évaluer leurs effets sur la gliogenèse entérique (Lefevre *et al.*, 2023). Le même problème se pose avec l'utilisation du système Cre/Lox, afin de déléter conditionnellement des gènes candidats. Par exemple, le marqueur pan-glial SOX10, qui englobe l'ensemble de la population gliale contrairement à la plupart des marqueurs plus tardifs, est également exprimé par les CCNE. Cela souligne la nécessité d'identifier de nouveaux marqueurs pan-gliaux, spécifiques de la glie et absents des précurseurs (Lefevre *et al.*, 2023). En revanche, les expériences gain-de-fonction, comme celles menées avec le modèle *Nr2fl^{Spt/Spt}* ou avec des lignées murines activant constitutivement la voie Notch (Bergeron *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2015; Ngan *et al.*, 2011), ont permis de contourner ces difficultés et d'apporter de nouvelles connaissances sur la gliogenèse entérique (Lefevre *et al.*, 2023).

1.2.2.3 Développement et maintien postnatal des cellules gliales entériques

Le développement postnatal du SNE a été abordé dans une section précédente. Outre son rôle essentiel dans la maturation neuronale, cette période est également déterminante pour l'établissement des réseaux gliaux, bien que les connaissances sur la maturation gliale postnatale demeurent encore limitées. Chez le rat, entre P1 et P36, l'analyse par immunohistochimie du côlon distal a révélé une augmentation progressive de l'expression des marqueurs gliaux GFAP et S100 β , associée à une modification de la localisation subcellulaire de ces marqueurs. Alors que S100 β est initialement restreint au noyau des CGE à P1, son expression s'étend à l'ensemble du corps cellulaire à P36. La signification biologique de ces changements reste toutefois à élucider. Par ailleurs, la même étude démontre que le butyrate, un acide gras à chaîne courte

sécrété par le microbiote après la naissance, module négativement la prolifération postnatale des CGE. Ces résultats mettent en évidence l'importance des signaux bactériens luminaux dans la maturation du réseau glial entérique (Cossais *et al.*, 2016).

La muqueuse subit également d'importants changements postnataux. À la naissance, elle est déjà colonisée par de rares neurones et leurs prolongements (McKeown *et al.*, 2001), mais la lamina propria et les villosités sont dépourvus de CGE. Chez la souris, ces CGE de la muqueuse apparaissent plus tardivement vers P10, puis cette population subit une phase d'expansion jusqu'à P38. Cela coïncide temporellement avec le sevrage, et ainsi avec les changements nutritifs et luminaux du tractus gastrointestinal. De manière intéressante, l'établissement des glies de la muqueuse dépend du microbiote, en particulier dans les villosités, où elles sont absentes chez les souris germ-free (Kabouridis et Pachnis, 2015). Cependant, les mécanismes moléculaires responsables du contrôle de la gliogenèse entérique par le microbiote sont encore méconnus (Baghdadi et Kim, 2023). Ce dernier régule également la migration centripète des CGE sur l'axe séro-muqueux depuis le plexus myentérique, afin de fournir continuellement des cellules à la muqueuse en perpétuel renouvellement lors de la vie adulte (Kabouridis et Pachnis, 2015). En effet pendant la vie, le pool de CGE est maintenu grâce à leur capacité de multipotence (Boesmans *et al.*, 2022; Lefevre *et al.*, 2023). Il s'agit d'un mécanisme nécessaire à l'homéostasie du GI, qui est soumis à de nombreux stress mécaniques, chimiques, ou encore microbiologiques, induisant des blessures. Les CGE peuvent ainsi générer des neurones ou des CGE dans plusieurs contextes pathologiques (Joseph *et al.*, 2011; Lefevre *et al.*, 2023). En condition physiologique, le niveau de gliogenèse entérique dans le PM est particulièrement faible. Le niveau de prolifération des CGE en homéostasie a été ainsi évalué à 1% de CGE GFAP+ et 2.8% de CGE S100 β + respectivement dans le PM du côlon et de l'iléon (Belkind-Gerson *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2011). PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) a été identifié récemment comme un régulateur de ce processus. Son inhibition conditionnelle dans les CGE PLP1+ stimule la prolifération et la gliogenèse postnatale (Woods *et al.*, 2024).

1.2.3 Diversité gliale

La dénomination « cellules gliales entériques » regroupe l'ensemble des cellules gliales du SNE. Cependant, cette population englobe une grande diversité cellulaire, marquée par une forte hétérogénéité. Bien que la diversité gliale n'ait pas encore été élucidée, plusieurs critères permettent de la délimiter : l'expression des marqueurs moléculaires gliaux, la morphologie et la topologie, leur profil transcriptionnel ainsi que leurs fonctions. Dans cette partie, nous utiliserons certains de ces critères afin de donner un aperçu de cette diversité.

1.2.3.1 Marqueurs moléculaires canoniques des cellules gliales entériques

Les marqueurs canoniques SOX10, FABP7, PLP1, S100 β , et GFAP ont longtemps été utilisés de façon interchangeable dans la littérature, alors que toutes les CGE ne coexpriment pas la totalité de ces marqueurs (Rao *et al.*, 2015). Cela constitue un premier niveau de complexité dans la caractérisation de la diversité gliale. Il convient de souligner que ces marqueurs, initialement étudiés chez le rongeur, sont conservés chez l'humain (Baidoo *et al.*, 2023; Prochera *et al.*, 2025) et que seuls les plus couramment employés dans la littérature seront mentionnés ici.

Le facteur de transcription SOX10, exprimé par les CCN juste avant leur délamination est maintenu dans les CCNE et les CGE. Il s'agit du marqueur le plus pan-glial. Toutefois, en raison de son expression commune avec les progéniteurs, son utilisation requiert l'association à d'autres marqueurs pour identifier spécifiquement les CGE différencierées. Il est également nécessaire de mentionner que, malgré la large expression de SOX10, de rares CGE sont négatives à ce marqueur mais expriment d'autres marqueurs gliaux comme GFAP ou SLC18A2 (Boesmans *et al.*, 2015; Lefevre *et al.*, 2023). Comme mentionné dans la section consacrée à la différenciation gliale, FABP7 est le premier marqueur exprimé par les CGE en cours de différenciation (Young *et al.*, 2003). Cependant, ce marqueur glial précoce est aujourd'hui moins utilisé dans la littérature par rapport à S100 β , PLP1 ou GFAP, qui reflètent des états plus différenciés (Charrier et Pilon, 2017).

En utilisant un modèle murin *PLP1-eGFP*, Rao et al. ont analysé l'expression de PLP1 dans des coupes transversales de la paroi intestinale de différentes régions à P28. Cela a permis de caractériser PLP1 comme un marqueur pan-glial, qui est en écrasante majorité coexprimé avec SOX10 (Rao *et al.*, 2015). Ces résultats ont également été confirmés chez l'humain, où PLP1 apparaît comme le marqueur délimitant le plus largement la population de la muqueuse (Prochera *et al.*, 2025). Néanmoins, une étude portant sur l'expression de *Plp1*, qui code pour deux protéines distinctes (PLP1 et DM20), a mis en évidence que l'isoforme DM20 est plus exprimée que PLP1 lors du développement postnatal, suggérant que PLP1 pourrait ne pas marquer l'ensemble des CGE pendant cette période (Patyal *et al.*, 2023). Parmi les cellules PLP1+ la majorité exprime S100 β , alors que GFAP présente une expression plus restreinte et dépendante de la localisation, plus de la moitié des CGE étant négatives pour ce marqueur. Les CGE situées dans les couches musculaires lisses constituent une population GFAP- (Rao *et al.*, 2015). Bien que GFAP ait été utilisé précédemment pour réaliser une déplétion ou une perturbation ciblée des CGE afin d'en évaluer l'impact fonctionnel (Bush *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2001), ce marqueur ne couvre qu'une sous-population gliale, ce qui doit être pris en compte lors de l'interprétation de ces études fonctionnelles. De plus, l'induction d'un modèle de traçage de lignage cellulaire *GFAPCreER|YFP* a mis en évidence une importante

plasticité de son expression : près de 23% des CGE myentériques intraganglionnaires deviennent GFAP- 7 jours après induction (Boesmans *et al.*, 2015). En plus de cette variabilité basale, l'expression de GFAP est connue pour fluctuer dans divers contextes pathologiques (Ochoa-Cortes *et al.*, 2016). GFAP est ainsi un marqueur de gliose entérique, correspondant à un phénotype réactif/activé des CGE, dont l'expression est augmentée dans divers contextes lésionnels ou inflammatoires (Baghdadi *et al.*, 2022; Bali et Grubišić, 2024; von Boyen *et al.*, 2011). Cependant, la fonction exacte de cette protéine reste méconnue, et il n'est pas encore établi si son expression définit une sous-population gliale spécifique ou reflète plutôt une modification d'état cellulaire en réponse à des changements environnementaux.

La composition moléculaire des différentes classes de neurones est bien connue, reposant sur l'utilisation d'un marqueur unique ou d'une combinaison de marqueurs qui permet de décrire ces classes. À ce jour, il n'existe pas de classification équivalente pour décrire les sous-populations gliales (Gonzales et Gulbransen, 2025; Morarach *et al.*, 2021). Seuls les marqueurs canoniques décrits précédemment sont disponible mais leur expression commune avec les CCN, CCNE et les PCS complique leur utilisation. D'où l'importance de caractériser de nouveaux marqueurs moléculaires, et ainsi de délimiter de nouvelles populations. Cette situation est toutefois amenée à évoluer grâce à l'utilisation des techniques de séquençage haut débit, comme nous le verrons dans la section suivante.

1.2.3.2 Identification de nouvelles populations gliales par séquençage de cellules uniques

Le scRNA-seq est une méthode révolutionnaire, développée en 2009 (Tang *et al.*, 2009), qui permet de cartographier le transcriptome à l'échelle de la cellule individuelle. Contrairement au séquençage en vrac, elle offre la possibilité de caractériser l'hétérogénéité cellulaire en définissant des populations selon la ressemblance de leur profil transcriptionnel, d'identifier des populations cellulaires rares, d'inférer des trajectoires de différenciation, déterminer des réseaux de régulation génétique, analyser des états transitionnels. Dans le domaine du SNE, cette méthode a permis d'abord de décrire la diversité neuronale. Des atlas caractérisant de nombreuses populations neuronales entériques ont été réalisés, et le code moléculaire exprimé par certaines d'entre elles a été validé *in vivo* (Drokhlyansky *et al.*, 2020; Morarach *et al.*, 2021). Si le nombre de jeux de données de scRNA-seq consacrés au SNE ne cesse d'augmenter, les études ciblant spécifiquement les populations gliales restent limitées. À ce jour, parmi l'ensemble des études s'intéressant aux CGE, jusqu'à neuf populations transcriptionnelles gliales ont été décrites (Guyer *et al.*, 2023; Lefevre *et al.*, 2023). La comparaison des transcrits enrichis dans les populations gliales définies par plusieurs études indépendantes a mis en évidence des gènes communs, suggérant de potentiels marqueurs moléculaires de nouvelles sous-populations, tels que *Slc18a2*. Toutefois, en raison du découplage entre transcription et traduction, et de la variabilité d'expression protéique influençant la détectabilité par

microscopie, la validation *in vivo* de la distribution de ces marqueurs par immunofluorescence demeure indispensable. À ce jour, il n'existe aucun consensus concernant le nombre de sous-populations transcriptionnelles gliales, ou la liste des marqueurs candidats, en raison de la grande variabilité des conditions expérimentales et des analyses de données de scRNA-seq. Néanmoins, l'ensemble de ces données ouvre la voie à de futures études visant à caractériser à la distribution de nouveaux marqueurs gliaux dans le SNE. L'ensemble des études ayant analysé les CGE par scRNA-seq, avec les conditions expérimentales et le nombre de populations identifiées sont présentées dans le tableau 1.2.

Références	Conditions expérimentales	Signatures transcriptionnelles
(Zeisel <i>et al.</i> , 2018)	scRNA-seq de cellules tdTomato+ du PM et des muscles du petit intestin de souris <i>Wnt1-Cre;R26R-tdTomato</i>	7 populations gliales (ENTG1-7), dont 1 en prolifération et 3 exprimant <i>Slc18a2</i> .
(Drokhlyansky <i>et al.</i> , 2020)	snRNA-seq (single nuclei RNA sequencing) de noyaux GFP+ et ARN lié aux ribosomes du petit intestin et du colon (pleine épaisseur) de souris <i>Sox10-Cre;INTACT, Wnt1-Cre2;INTACT</i> et <i>Uchl1-H2BmCherry:GFPgpi</i> , à différents âges (11-14 semaines VS 50-52 semaines), sexes et phases du cycle circadien.	3 populations transcriptionnelles gliales (Glia1-3) enrichies respectivement en transcrits suivant : <i>Gfra2, Slc18a2, Ntsr1</i> . Pas de différences dans ces populations selon la région intestinale, l'âge, le sexe ou le cycle circadien.
(Wright <i>et al.</i> , 2021)	snRNA de noyaux mCherry+ obtenus du PM et des couches musculaires du colon distal de souris <i>Wnt1-Cre;R26R-H2B-mCherry</i> à P47-52.	4 populations transcriptionnelles gliales (Glia1-4)
(Baghdadi <i>et al.</i> , 2022)	Réanalyse de données de scRNA-seq obtenues à partir cellules mésenchymateuses du colon, isolées de la muqueuse de souris WT adultes (Roulis <i>et al.</i> , 2020).	3 populations transcriptionnelles gliales (EGC#0-EGC#2) en fonction du pourcentage de cellules exprimant <i>GFAP</i> et <i>PLP1</i> : Gfap ^{High} /Plp1 ^{Mid} , Gfap ^{Low} /Plp1 ^{High} , et Gfap ^{Mid} /Plp1 ^{Low} .
	Réanalyse de données de scRNA-seq obtenues à partir de cellules stromales, isolées de biopsie de muqueuse de contrôles sains et de patients atteints de colite ulcéreuse, de 18 à 90 ans.	4 populations transcriptionnelles gliales (hEGC#0-hEGC#3), avec hEGC#1 et 2 enrichis chez les contrôles sains et hEGC#0 et 3 enrichis chez les patients. hEGC#1 correspond à la population murine EGC#1, hEGC#0 à EGC#0.
(Guyer <i>et al.</i> , 2023)	scRNA-seq combiné avec du ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin sequencing) (scMulti-seq) de cellules GFP+ du PM et des muscles du petit intestin de souris <i>Plp1-GFP</i> à P14.	9 populations transcriptionnelles gliales selon l'expression génétique, l'accessibilité de la chromatine au niveau des pics des marqueurs neuronaux et des patterns d'enrichissement des motifs. 2 populations en réplications, 4 avec la chromatine

		décompactée, 1 avec la chromatine compactée, et 2 orientées vers la neurogenèse. L'une des populations neurogéniques est particulièrement enrichie en transcrits <i>Slc18a2</i> , <i>Ramp1</i> et <i>Cpe</i> .
(Schneider, S. K. <i>et al.</i> , 2023)	scRNA-seq de cellules GFP+ obtenues de la pleine épaisseur du côlon de souris adultes <i>Sox10-Cre;INTACT</i> qui ont subi du stress de contention ou non.	4 populations transcriptionnelles gliales, dont une uniquement présente dans la condition de stress psychologique (eGAPs – enteric glia associated with psychological stress) et exprimant fortement <i>Nr4a1/2/3</i> .
(Scavuzzo <i>et al.</i> , 2023)	scRNA-seq de cellules RFP+ obtenues du duodénum de souris adultes <i>Sox10-cre; Ai14(RCL-tdT)</i>	7 populations transcriptionnelles gliales, dont une population <i>PIEZO2+</i> impliquée spécifiquement dans la motilité intestinale

Tableau 1.1 : Récapitulatif des sous-types transcriptionnels de CGE

Adapté de (Lefevre *et al.*, 2023)

1.2.3.3 Classification topo-morphologique des cellules gliales entériques

La classification la plus couramment utilisée pour délimiter différents sous-types de CGE se base sur des critères topologiques (localisation de la cellule dans les plexus et la paroi intestinale) et morphologiques. Hanani et al. ont été les premiers à proposer une classification basée sur les morphologies des CGE en réalisant des marquages intestinaux chez le cochon d'inde. Ils ont décrit deux sous-types de CGE. Le premier correspond à des CGE localisées au sein des ganglions, présentant une morphologie similaire aux astrocytes protoplasmiques, avec leur forme étoilée et leurs prolongements courts, irrégulièrement ramifiés. Le second, localisé dans les fibres interganglionnaires, est assimilé aux astrocytes fibreux, avec de longs prolongements orientés parallèlement aux fibres neuronales et moins ramifiés (Hanani et Reichenbach, 1994). D'autres sous-types ont été ensuite identifiés dans la littérature (Gulbransen et Sharkey, 2012; Savidge *et al.*, 2007), mais c'est avec les travaux de Boesmans et al. décrivant l'ensemble des sous-types topo-morphologiques gliaux chez la souris adulte, que la classification a été finalement établie (Boesmans *et al.*, 2015). Pour ce faire, les auteurs ont utilisé un système de marquage génétique MADM (Mosaic Analysis with Double Markers), qui induit l'expression d'un fluorophore dans des cellules individualisées et leurs clones, permettant une analyse morphologique par microscopie à la résolution de cellules uniques *in vivo* chez la souris (Zong *et al.*, 2005).

Ainsi 4 principaux sous-types topo-morphologiques ont été caractérisés (Figure 1.8). Les types I, aussi appelés « protoplasmiques », sont localisés dans les ganglions myentériques (Type I_{MP}) et sous-muqueux (Type I_{SMP}), et présentent de multiples prolongements irréguliers et hautement ramifiés, s'étendant dans toutes les directions. Ces prolongements se terminent souvent par des structures de type « end-feet like » et sont entremêlés avec ceux des CGE voisines, tout en établissant de multiples contacts avec les neurones du même ganglion (Boesmans *et al.*, 2015; Hanani et Reichenbach, 1994). Les types II, dits « fibreux », sont situés au bord ou dans les faisceaux de fibres interganglionnaires. Ces cellules présentent de fins prolongements émergeant d'un côté de la cellule disposés parallèlement entre eux ainsi qu'aux fibres neuronales. Contrairement aux cellules de Schwann, ces prolongements n'enveloppent pas les fibres nerveuses pour former de gaine myélinique (Boesmans *et al.*, 2015; Hanani et Reichenbach, 1994). Les types III se placent quant à eux hors des ganglions et des fibres interganglionnaires, mais dans le même plan tissulaire du PM et du PSM. Leur morphologie consiste en quatre principaux prolongements se ramifiant secondairement. Ces cellules forment ainsi une matrice dans les régions extraganglionnaires et s'associent à de fines fibres neuronales. Leurs prolongements peuvent aussi envelopper de petits vaisseaux sanguins. On distingue ces types III_{PM/PSM} des types III_{Mucosa}, situés dans la lamina propria de la muqueuse, qui présentent une morphologie similaire malgré cette différence topologique (Boesmans *et al.*, 2015; Gulbransen et Sharkey, 2012; Savidge *et al.*, 2007). Enfin les types IV, caractérisés par une morphologie

bipolaire avec deux prolongements émergeant de la cellule, sont les seules CGE localisées dans les couches musculaires lisses circulaires et longitudinales, associées avec de fines fibres nerveuses (Boesmans *et al.*, 2015; Gulbransen et Sharkey, 2012; Vanderwinden *et al.*, 2003). Ces sous-types topo-morphologiques semblent être conservés entre les régions intestinales et les espèces. Initialement décrits chez le cochon d'inde puis la souris, ils ont également été identifiés chez l'humain et le poisson-zèbre (Graham *et al.*, 2020; Hanani et Reichenbach, 1994; Liu *et al.*, 2013; McCallum *et al.*, 2020). De même, ces sous-types sont retrouvés dans l'œsophage murin (Kapitza *et al.*, 2021). À ce jour, les mécanismes moléculaires responsables de l'acquisition de cette diversité topo-morphologique sont totalement méconnus.

Boesmans *et al.* ont également évalué l'expression des marqueurs canoniques par ces sous-types chez la souris adulte, en réalisant des co-marquages pour SOX10, S100 β et GFAP. Alors que SOX10 et S100 β sont fortement coexprimés dans l'ensemble des sous-types, GFAP est principalement exprimé par les types I, la majorité des types II et III étant négatifs pour ce marqueur. Ainsi, aucun des marqueurs canoniques ne permet de délimiter clairement un ou des sous-types topo-morphologiques (Boesmans *et al.*, 2015). SLC18A2, identifié comme marqueur candidat d'une sous-population transcriptionnelle gliale dans plusieurs études utilisant le scRNA-seq, a fait l'objet d'une analyse préliminaire par immunofluorescence afin de préciser son expression parmi ces sous-types. Ce marqueur ne permet pas de délimiter un sous-type topo-morphologique unique, mais est exprimé dans un sous-groupe de CGE dont l'identité et la fonction restent à élucider (Figure 1.9) (Lefevre *et al.*, 2023). À ce jour, nous ignorons si les sous-types topo-morphologiques présentent des profils transcriptionnels distincts et s'ils peuvent être distingués par un ou plusieurs marqueurs moléculaires, à l'instar des neurones. L'exploration de l'identité et de la diversité gliale pourrait probablement être aussi complexifiée par l'importante plasticité gliale. Comme mentionné précédemment pour GFAP, les cellules peuvent exprimer dynamiquement certains marqueurs en réponse à leur environnement (Seguella et Gulbransen, 2021). Enfin, l'acquisition de cette topo-morphologie, ainsi que la plasticité des sous-types demeurent inconnus.

L'absence de marqueur spécifique pour chaque sous-type topo-morphologique complique particulièrement l'étude fonctionnelle de ces populations, qui permettrait d'évaluer la pertinence biologique de cette classification. Sans de tels marqueurs, il n'est pas possible d'utiliser des techniques d'isolation et d'enrichissement cellulaire comme le tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) ou de réaliser une ablation ciblée des sous-types dans des modèles murins. Néanmoins, de rares études ont élégamment établies des différences fonctionnelles de ces sous-types. Par imagerie calcique en direct, l'évaluation de la réponse calcique gliale à une stimulation à l'ATP (Adénosine triphosphate), l'un des principaux neurotransmetteurs de la communication purinergique, a révélé des réponses différentes selon les sous-

types. Ainsi, les types I répondent très majoritairement à la stimulation à l'ATP, alors que les types II et III répondent faiblement ; suggérant qu'il s'agit de populations fonctionnellement distinctes dans le contexte de la communication neuro-gliale et de la réponse aux neurotransmetteurs (Boesmans *et al.*, 2015). Avec la même technique, une autre étude a mis en évidence une hétérogénéité fonctionnelle supplémentaire parmi les types I, qui présentent quatre profils de réponse calcique distincts à la stimulation par l'ADP et de la CCK (cholecystokinine), un neuropeptide sécrété dans le duodénum et impliqué dans la communication neuro-gliale (Seguella *et al.*, 2022). Les types III_{mucosa} correspondent à la seule population gliale située dans la muqueuse (hors du PSM), ce qui permet de les étudier de manière isolée. Baghdadi *et al.* ont notamment montré, dans un modèle *Gfap-creERT2;R26^{DTA}* présentant une ablation ciblée des CGE GFAP+, une altération de la régénération épithéliale en homéostasie et après lésion. Cette régulation gliale de la régénération s'est avérée être dépendante de la signalisation Wnt (Baghdadi *et al.*, 2022). Le rôle des CGE dans le GI ne se limite pas à ces quelques fonctions décrites, mais est probablement bien plus important. Cependant, l'implication des différents sous-types topo-morphologiques dans ces fonctions, ainsi que dans les mécanismes physiopathologiques, reste à élucider. Dans la prochaine partie seront présentés les fonctions générales des CGE.

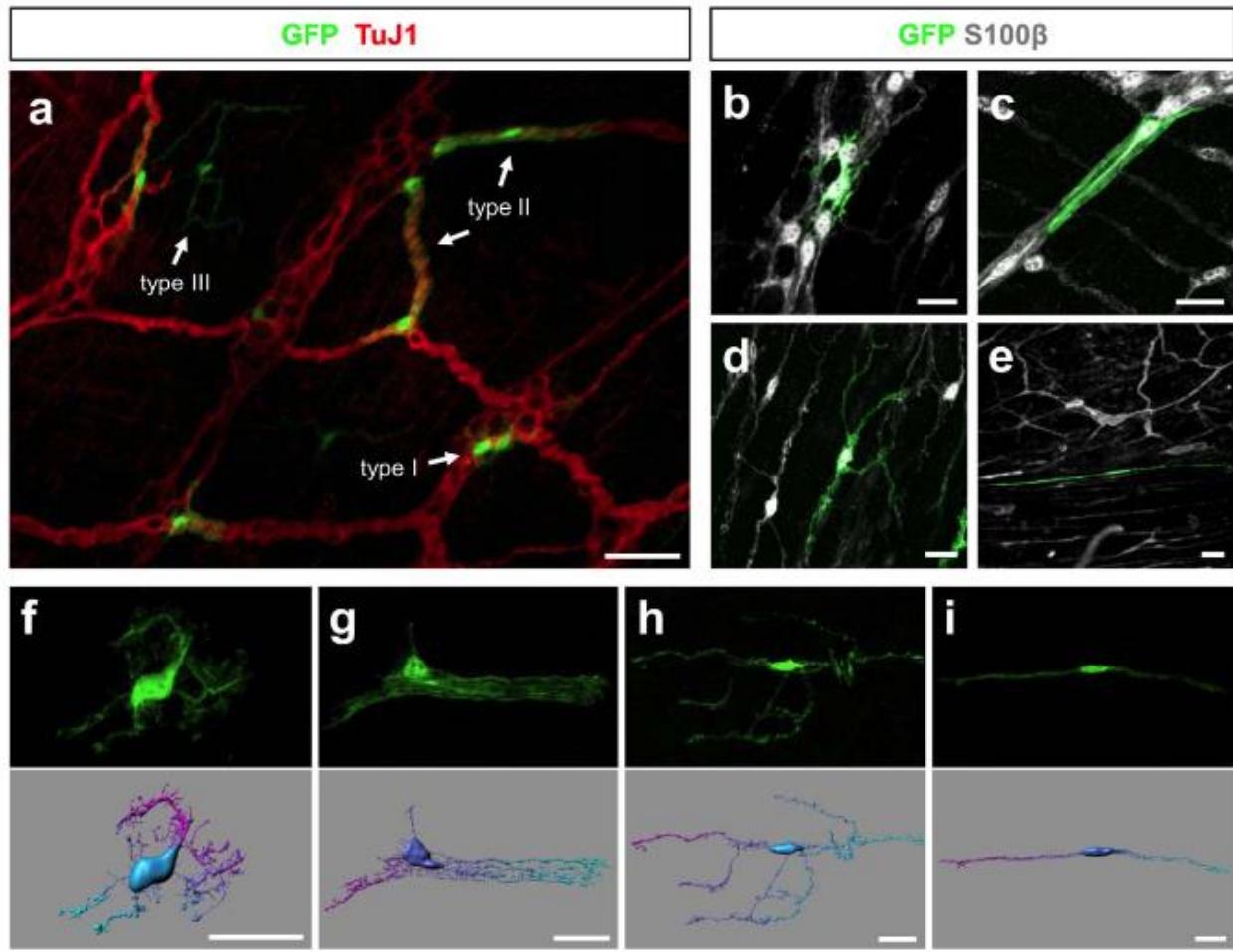


Figure 1.8 : Expression de GFP par différents sous-types topo-morphologiques de CGE individualisés chez des souris *Sox10Cre|MADM*.

(A) Expression individualisée de GFP (en vert) dans des types I, II et III du plexus myentérique. Les fibres neuronales sont marquées avec TUJ1 (ou β III-Tubuline) en rouge. (B-E) Co-marquage avec GFP et le marqueur glial S100 β (en gris) des types I à IV. (F-I) Morphologie des 4 sous-types de CGE (dans l'ordre de F à I) par microscopie confocale et reconstruction 3D. Barre d'échelle, 50 μ m (A) et 20 μ m (B-I). Tiré de (Boesmans *et al.*, 2015)

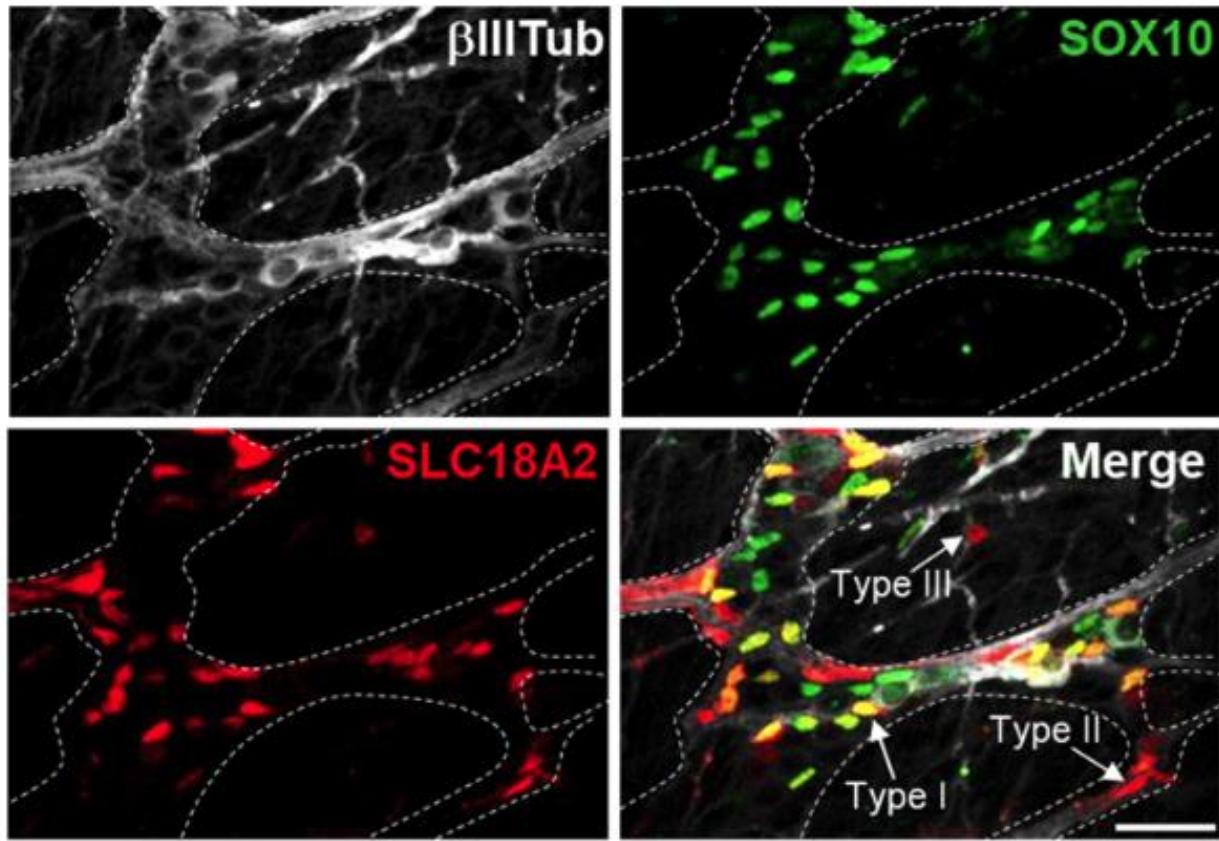


Figure 1.9 : Distribution de l'expression de SLC18A2 dans le plexus myentérique de souris WT à P10. Marquage d'immunofluorescence avec les fibres neuronales β III-Tubuline+ (en blanc) et les CGE SOX10+ (en vert), montrant que SLC18A2 (en rouge) marque majoritairement des types I SOX10+, mais aussi des types II et III SOX10- (voir flèches dans le composite). Barre d'échelle, 100 μ m. Tiré de (Lefevre *et al.*, 2023)

1.2.4 Fonctions physiologiques des cellules gliales entériques

1.2.4.1 Rôle de support

Comme les autres cellules gliales, l'une des fonctions principales des CGE consiste à assurer le support et l'optimisation des fonctions neuronales. Ce rôle de soutien se divise en plusieurs composantes. Tout d'abord, les CGE expriment des précurseurs de neurotransmetteurs et des enzymes de synthèse, dont respectivement la L-arginine (Nagahama *et al.*, 2001) et la glutamine synthase (Jessen et Mirsky, 1983). Cependant, leur participation au support de la neurotransmission nitrinergique et glutaminergique nécessite d'être encore évaluée. Elles régulent également la disponibilité des neurotransmetteurs dans l'espace extracellulaire via l'expression de transporteurs de recapture, tel que le transporteur à l'acide gamma-aminobutyrique 2 (GAT2) (Fletcher *et al.*, 2002) ; et d'enzymes de dégradation de composés neuroactifs (ex : ATP) comme la diphosphohydrolase nucleoside triphosphate (NTPDase2) (Grubišić *et al.*, 2019). Le stress oxydatif joue un rôle central dans des neuropathies du SNE (Stavely *et al.*, 2023). Dans ce contexte, les CGE exercent une fonction de défense antioxydante via la synthèse de glutathion, indispensable pour la survie des neurones entériques (Brown et Gulbransen, 2018). Elles participent aussi à la maturation des réseaux neuronaux en sécrétant des facteurs neurotrophes tel que le facteur de croissance nerveux (NGF), le facteur de croissance proépidermal (proEGF) et le GDNF. En coculture avec des neurones, elles stimulent la formation des connections synaptiques et augmentent les ramifications du réseau, via la signalisation purinergique et le GDNF (Le Berre-Scoul *et al.*, 2017). Ces fonctions sont communes aux astrocytes. Toutefois, il reste encore à déterminer si les CGE partagent d'autres rôles caractéristiques, tels que la régulation du pH, l'homéostasie ionique, ou encore la synthèse et le stockage du glycogène (Seguella et Gulbransen, 2021).

1.2.4.2 Neurogenèse

En plus de leur plasticité, les CGE possèdent une capacité d'auto-renouvellement et de différenciation en neurones entériques. Cependant, ces propriétés varient selon l'espèce étudiée et le contexte expérimental. Les différentes études réalisées chez la souris, leurs conditions expérimentales et leurs résultats ont été largement résumés dans la revue présentée en annexe (Lefevre *et al.*, 2023). Chez le poisson zèbre adulte, les CGE conservent la capacité de proliférer et de générer de nouveaux neurones dans un contexte homéostatique (McCallum *et al.*, 2020). En revanche, chez la souris adulte, les CGE présentent une multipotence limitée *in vivo* dans des conditions physiologiques, leur contribution à la neurogenèse étant quasiment indétectable comparativement à la gliogenèse (Belkind-Gerson *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2011; Laranjeira *et al.*, 2011). Cette compétence peut néanmoins être révélée en réponse à des lésions chimiques, comme après administration de benzalkonium chloride (BAC), qui induit une dénervation du SNE, ou au dextran sodium sulfalte (DSS), qui provoque des colites inflammatoires (Belkind-Gerson *et al.*, 2017;

Belkind-Gerson *et al.*, 2015; Joseph *et al.*, 2011). En culture, les CGE isolées de tissus adultes démontrent une capacité importante à se différencier non seulement en neurones et en CGE, mais aussi en myofibroblastes, suggérant une multipotence étendue (Joseph *et al.*, 2011). Néanmoins, la génération de myofibroblastes dérivés de CGE, ainsi que le contexte spécifique permettant ce processus, n'ont pas encore été déterminés *in vivo*. Les études évaluant la multipotence n'ont pas établi si cette propriété n'est restreinte qu'à des sous-types spécifiques de CGE. Guyer *et al.* ont identifié *in vivo* une population gliale intraganglionnaire, persistante chez l'adulte, qui présente un profil transcriptionnel et un état de compaction de la chromatine compatibles avec un potentiel neurogénique (Guyer *et al.*, 2023). Ces observations indiquent que toutes les CGE ne possèdent pas la compétence neurogénique, celle-ci semblant restreinte à des sous-types distincts. Leurs caractéristiques neurogéniques nécessitent plus d'investigation, notamment pour déterminer si des sous-types topo-morphologiques précis présentent spécifiquement ce potentiel. Enfin, les mécanismes sous-jacents à la neurogenèse dérivée de CGE sont encore largement méconnus. Une étude récente a déterminé par scRNA-seq que les CGE matures ont la capacité de réactiver des programmes neurogéniques en adoptant un profil d'ouverture de la chromatine au niveau de promoteurs de gènes pro-neuronaux, qui est similaire à celui des progéniteurs du SNE, dans des contextes de lésions intestinales (Laddach *et al.*, 2023). Pour conclure, une meilleure compréhension de ces mécanismes et des stimuli pro-neurogéniques serait essentielle pour exploiter la multipotence gliale dans le contexte de thérapies régénératives du SNE.

1.2.4.3 Circuits nerveux moteurs

Comme indiqué dans les sections précédentes, différents circuits neuronaux participent à la régulation de la motilité du GI. Les CGE entourent les corps cellulaires neuronaux ainsi que leurs prolongements, et communiquent de façon bidirectionnelle avec les neurones pour optimiser la régulation de la motilité intestinale (McClain *et al.*, 2015). L'ablation de CGE GFAP+, PLP1+ ou SOX10+ entraîne notamment une diminution du transit intestinal (Aubé *et al.*, 2006; Kovler *et al.*, 2021). Les CGE forment un réseau en étroite interaction avec les différents circuits neuronaux. Dans ces cellules, une élévation intracellulaire de calcium est induite suite à la stimulation de récepteurs gliaux par les principaux neurotransmetteurs impliqués dans la transmission synaptique myentérique, tels que l'ATP et l'acétylcholine (Delvalle *et al.*, 2018; Gulbransen *et al.*, 2010). Selon le circuit neuronal activé, différents groupes de CGE sont recrutés (Ahmadzai *et al.*, 2021) et modulent l'activité neuronale via une signalisation intracellulaire (libération d'ATP) médiée par la protéine de jonction connexine 43 (McClain *et al.*, 2015).

1.2.4.4 Fonctions épithéliales

Les CGE ont également des fonctions associées aux cellules épithéliales. La lamina propria est colonisée par une importante population de CGE situées à la base des cryptes mais également autour des villosités (Liu *et al.*, 2013). Leur proximité avec la muqueuse épithéliale permet la formation d'unités neurones-glies-épithélium (Neunlist *et al.*, 2013). Afin d'évaluer leur rôle dans la maintenance de la barrière épithéliale, plusieurs modèles d'ablation de CGE ont été utilisés dans la littérature. Les premières études suggéraient un rôle central des CGE, mais des limitations méthodologiques ont été la cause de résultats discordants (Bush *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2001). Par la suite, Rao *et al.* ont employé un modèle *Plp1^{CreER};Rosa26^{DTA}* ciblant spécifiquement l'ensemble des CGE, sans affecter les populations cellulaires avoisinantes. Contrairement à ce qui était attendu, la déplétion des CGE PLP1+ n'impacte pas l'intégrité de la barrière intestinale, mais modifie la motilité intestinale de façon sexe-dépendante (Rao *et al.*, 2017). Une étude plus récente, utilisant également un système génétique d'ablation cellulaire double via les marqueurs PLP1 et GFAP, démontre cependant qu'une sous-population de CGE GFAP+ joue un rôle important dans le maintien du renouvellement des cellules souches épithéliales via la signalisation WNT, ainsi que dans la régénération à la suite d'une blessure (Baghdadi *et al.*, 2022). In vitro, des expériences de coculture ont démontré que les CGE modulent la fonction épithéliale de façon paracrine, via la sécrétion de facteurs dont : le GDNF (Meir *et al.*, 2021), le S-nitrosoglutathione (Savidge *et al.*, 2007), des métabolites dérivés des lipides (Bach-Ngohou *et al.*, 2010), le TGF-β (Neunlist *et al.*, 2007) et le proEGF1 (Van Landeghem *et al.*, 2011). À titre d'exemple, l'interaction GDNF/RET (exprimé par les cellules épithéliales) stabilise les jonctions serrées in vitro et permet de rétablir l'homéostasie de la barrière dans un contexte inflammatoire in vivo (Meir *et al.*, 2019; Meir *et al.*, 2021).

1.2.4.5 Régulation immunitaire

L'intestin représente le plus grand organe immunitaire de l'organisme. Quant aux CGE, elle constituent une interface idéale pour les interactions neuro-immunes, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie intestinale. Elles ont la capacité de détecter les motifs moléculaires associés aux micro-organismes ou aux dommages cellulaires, ainsi que des signaux dérivés des cellules immunitaires (comme les cytokines), via l'expression d'une large gamme de récepteurs (ex : TLR, récepteur à l'interféron γ (IFN γ)) et de leur machinerie associée pour répondre aux stimuli inflammatoires. Après stimulation, les CGE sécrètent des molécules pro- et anti-inflammatoires (ex : cytokines) qui modulent la réponse immunitaire, et leur environnement comme les cellules épithéliales qui constituent une défense de première ligne aux pathogènes (Progatzky et Pachnis, 2022). En condition inflammatoire ou infectieuse, les CGE peuvent acquérir un état cellulaire « réactif » caractérisé par des modifications de l'expression de GFAP, de leur morphologie, de la synthèse de cytokines et de leur profil transcriptionnel ; et ainsi participer à la réponse inflammatoire

(Seguella et Gulbransen, 2021). Également, elles interagissent étroitement avec la composante innée de l'immunité. À titre d'exemple, elles communiquent avec les macrophages résidents de la couche musculaire externe de l'intestin (« muscularis macrophages »). Lors de lésions musculaires ou d'inflammation intestinale chronique, elles peuvent stimuler le recrutement des monocytes puis induire leur différenciation et activation vers des profils pro-résolutif ou pro-inflammatoires, via la sécrétion de TGF- β , CCL-2 et M-CSF (Grubišić *et al.*, 2022; Grubišić *et al.*, 2020; Stakenborg *et al.*, 2022). Les CGE modulent également l'activité des cellules lymphoïdes innées (ILC3 – Innate lymphoid cells 3), qui ont un rôle central dans la défense de la muqueuse. Ces cellules expriment le récepteur RET, activé par le GDNF sécrété par les CGE voisines, ce qui induit la production d'IL-22 (Ibiza *et al.*, 2016). De plus, la contribution des CGE ne s'arrête pas à la régulation du système immunitaire innée, et s'étend à la composante adaptative. En réponse à l'IFN γ et au LPS, elles expriment le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) et assurent une fonction de cellules présentatrices d'antigènes, activant notamment les lymphocytes T CD4+, dont les Th17 et les T régulateurs (Treg), influençant ainsi la tolérance immunitaire et l'intégrité de la barrière intestinale (Chow *et al.*, 2021). À ce jour, il reste incertain si une ou plusieurs sous-populations gliales sont immunocompétentes *in vivo*. Progatzky et al. ont commencé à explorer cette question via une analyse scRNA-seq de CGE dans des contextes de colite ulcérale et d'infection par un helminthe. Ils ont identifié une sous-population gliale enrichie en transcrits liés à l'activation immunitaire, notamment dans la voie de réponse à l'IFN γ , et caractérisée par une forte expression de GFAP (Progatzky *et al.*, 2021).

Pour conclure, les CGE s'imposent comme des éléments centraux du SNE, présentant un développement complexe, au phénotype varié et des fonctions multiples, qui vont bien au-delà de leur rôle traditionnel de cellules de soutien. La section suivante abordera les neurocristopathies affectant le SNE.

1.3 Les neurocristopathies

Utilisé pour la première fois en 1974 par Bolande, le terme « neurocristopathie » désigne un large ensemble hétérogène de maladies et syndromes, causés par une altération des processus de colonisation des CCN (Bolande, 1997). La colonisation englobe plusieurs phénomènes biologiques dont la migration, la prolifération, la survie et la différenciation des CCN, qui sont étroitement régulés par des réseaux de régulation génétique et des signaux extrinsèques (Vega-Lopez *et al.*, 2018). Leur perturbation compromet le développement de nombreux types cellulaires dérivés des CCN. Cela a pour conséquence d'affecter un grand nombre de tissus et d'organes (Pilon, 2021). Selon la neurocristopathie considérée, les manifestations cliniques peuvent être isolées ou combinées, incluant des malformations osseuses crânio-faciales, des dysfonctions de l'oreille interne et du tractus gastro-intestinal, des défauts de pigmentation, des syndromes aux manifestations complexes, ou encore des cancers (Bergeron *et al.*, 2016; Soret *et al.*, 2015; Vega-Lopez *et al.*, 2018). Les neurocristopathies sont des pathologies congénitales rares, qui affectent de nombreux enfants. Cependant, les traitements actuels demeurent limités et incluent parfois des chirurgies invasives, dont les effets secondaires impactent à long terme leur survie et leur qualité de vie. D'où l'importance d'étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents à la colonisation des CCN et de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans les sections suivantes seront abordées deux neurocristopathies majeures : HSCR et le SW4.

1.3.1 La maladie de Hirschsprung

La HSCR, aussi connue sous la dénomination de mégacôlon aganglionnaire est une neurocristopathie rare et sévère caractérisée par un développement anormal du SNE. Décrise pour la première fois en 1886 par Harald Hirschprung, il s'agit du trouble de la motilité intestinale congénital le plus fréquent, avec une prévalence mondiale estimée entre 1 et 2.6 pour 10 000 naissances (chiffres variants géographiquement et selon les différentes populations et ethnicités) (Montalva *et al.*, 2023). Cette maladie pédiatrique se définit par une absence totale de ganglions nerveux dans la portion distale du GI, entraînant une obstruction fonctionnelle, menant à la constipation, la distension abdominale et les vomissements (Figure 1.10). Le diagnostic est établi dans 80% des cas lors de la période néonatale (4 premières semaines de vie), typiquement devant un retard d'expulsion du méconium supérieur à 24 h, et confirmé par une biopsie rectale démontrant l'aganglionose (Best *et al.*, 2014; Montalva *et al.*, 2023). Selon l'étendue de l'aganglionose, on distingue différents sous-types d'HSCR, chacun avec une prévalence variable (Figure 1.11). L'unique traitement existant de cette pathologie consiste en une résection chirurgicale de la section aganglionnaire et la création d'une anastomose (connexion chirurgicale entre deux structures tubulaires) entre l'intestin normalement innervé et le canal anal, selon la technique dite du pull-through (Swenson *et al.*, 1949). Malgré la prise en charge chirurgicale, de nombreux patients développent des complications à court et à long terme,

incluant des symptômes obstructifs, des épisodes d’entérocolites et des troubles de continence (Huerta *et al.*, 2023; Rintala et Pakarinen, 2012). Face à ces limites, des approches alternatives sont actuellement explorées, notamment les thérapies cellulaires et les stratégies de régénération *in situ* visant à restaurer un SNE fonctionnel dans les segments aganglionnaires lors de la période postnatale (Mueller et Goldstein, 2022; Soret *et al.*, 2020)

HSCR est une maladie non mendéienne, multigénique et sexe-dépendante (ratio garçon/fille de 4:1), caractérisée par une pénétrance partielle et une hétérogénéité génétique importante, associées à une sévérité variable. Cette pathologie multifactorielle est aussi favorisée par des facteurs environnementaux, bien qu’ils semblent jouer un rôle mineur comparé à celui des facteurs génétiques. Une mutation délétère unique est responsable d’environ 20% des cas, alors qu’une combinaison de variants génétiques est impliquée dans 80% des cas. À ce jour, des variants sur pas moins de 24 gènes ont été identifiés comme liés à HSCR (Tilghman *et al.*, 2019). Nombre de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation GDNF/RET et EDN3/EDNRB, qui comme indiqué précédemment, sont essentielles dans les processus de colonisation des CCN, lors du développement du SNE (Heuckeroth, 2018). La voie GDNF/RET a été la première identifiée et des mutations (particulièrement perte de fonction) dans *RET* sont les plus fréquemment observées chez les patients HSCR (Lyonnet *et al.*, 1993). En effet, les variants de *RET* (plus de 100 mutations ont été identifiées) sont impliqués dans 15-35% d’HSCR sporadique et environ 50% d’HSCR familial (Heuckeroth, 2018). Également, des mutations des gènes codants pour les facteurs de transcription *Sox10*, *Zfxh1*, *Gata2* et *Phox2b* sont également impliquées dans la pathogenèse d’HSCR (Heuckeroth, 2018; Montalva *et al.*, 2023). Toutefois, en raison de la pénétrance partielle, les mutations dans des gènes connus n’impliquent pas forcément des manifestations cliniques, qui dépendent d’autres facteurs de régulation épigénétique (Tilghman *et al.*, 2019; Torroglosa *et al.*, 2019). A titre d’exemple, le promoteur de *RET* est susceptible d’être méthylé (Munnes *et al.*, 1998). Enfin, outre les facteurs génétiques et épigénétiques régulant la colonisation des CCN, des altérations des facteurs du microenvironnement cellulaire, comme la matrice extracellulaire, peuvent être impliqués dans la pathogenèse d’HSCR. Ainsi, chez les souris Holstein, une mutagenèse insertionnelle induit une surexpression de *Col6a4* (collagène VI), ce qui ralentit la migration des CCN et entraîne une aganglionose colique distale. Des observations similaires ont été rapportées dans des tissus humains (Soret *et al.*, 2015).

HSCR constitue une pathologie isolée chez 70% des enfants atteints, cependant elle peut se manifester de façon associée à des syndromes génétiques ou des anomalies chromosomiques (Moore, 2012). Ainsi des anomalies chromosomiques peuvent être observées chez 12% des patients, dont la trisomie 21 est la plus

commune (Best *et al.*, 2014). Parmi les syndromes fréquemment associés à HSCR, on peut nommer le syndrome de Waardenburg-Shah (SW), qui sera présenté dans la partie suivante.

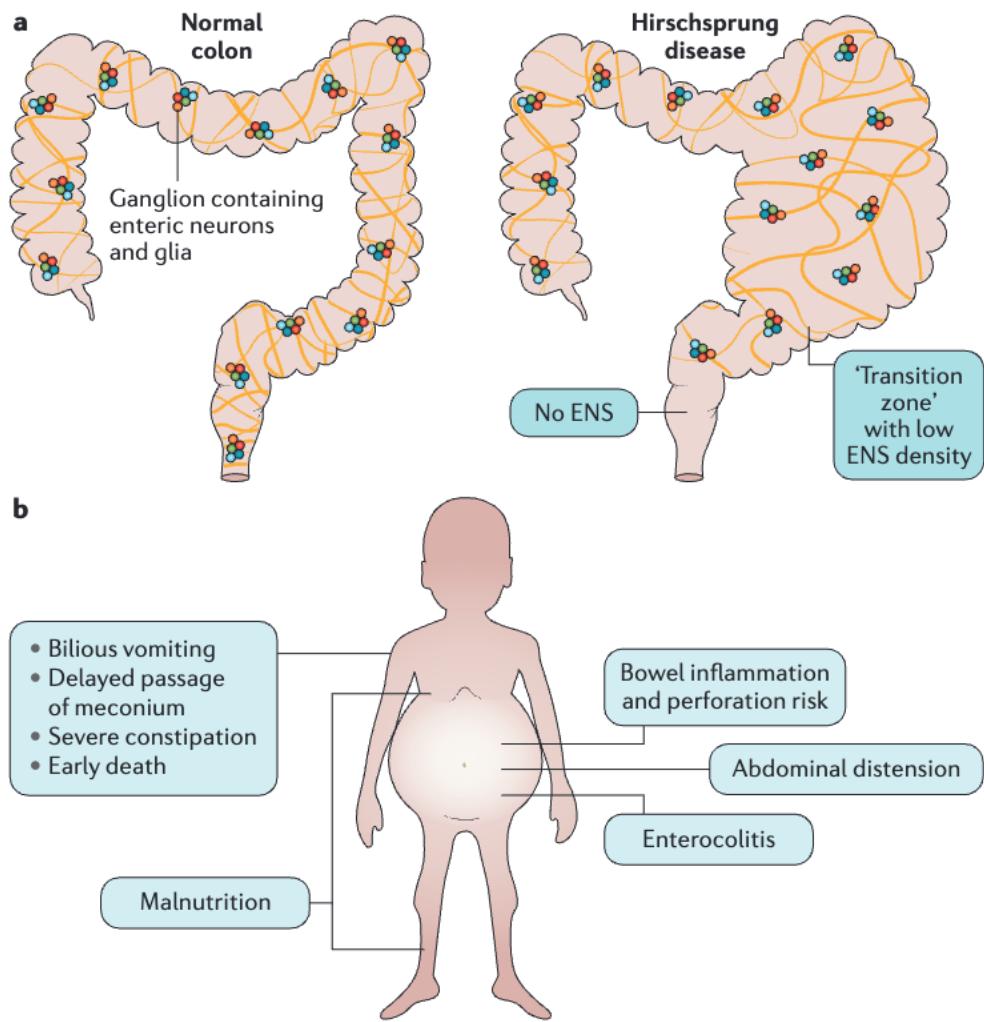


Figure 1.10 : La maladie de Hirschsprung, le SNE et les manifestations cliniques

(A) Comparaison entre le côlon sain et le côlon d'un patient HSCR, dénué de SNE dans sa partie terminale. La partie aganglionnaire se contracte toniquement, provoquant une obstruction fonctionnelle. L'intestin proximal, dans lequel le SNE s'est développé, est dilaté à cause des neurones moteurs inhibiteurs qui induisent la relaxation musculaire. Dans la zone de transition, la densité neuronale est réduite. (B) Manifestations cliniques de HSCR. Adapté de (Heuckeroth, 2018)

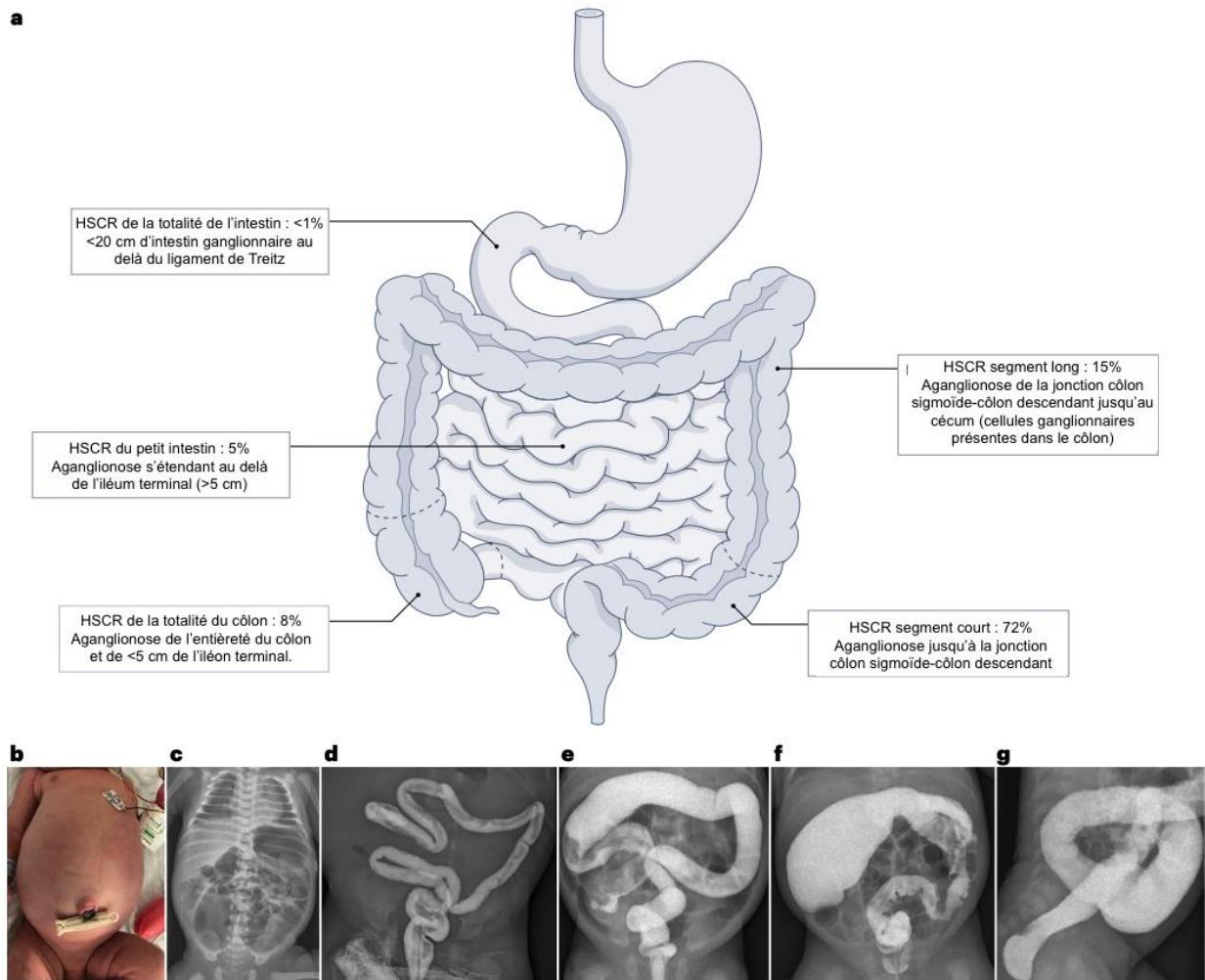


Figure 1.11 : Les différents sous-types de HSCR et leur diagnostique radiologique.

(A) Différents sous-types et incidence selon la longueur de l'aganglionose. (B) Distension abdominale chez un nouveau-né ayant HSCR concomitant au passage retardé du méconium et des vomissements bilieux. (C) Radiographie abdominale montrant une distension intestinale diffuse et de l'air dans le pelvis d'un nouveau-né atteint d'HSCR. (D-G) Lavements barytés montrant : un micro-côlon d'un nouveau-né avec HSCR au niveau du petit intestin, s'étendant au-delà de l'iléum terminal (D) ; un côlon en forme de point d'interrogation (E) ; une zone de transition dans le côlon transverse, avec un cæcum distendu et un côlon distal étroit, ainsi que des contractions en dent de scie. (F) ; une zone de transition dans le côlon sigmoïde (G). Extrait de (Montalva *et al.*, 2023)

1.3.2 Le syndrome de Waardenburg

Décrit pour la première fois par Waardenburg en 1947, le SW associe des troubles de l'audition et de la pigmentation (Waardenburg, 1951). Il s'agit d'un syndrome congénital rare dont l'incidence est estimée à environ 1/42 000 dans la population générale (Pingault *et al.*, 2010). À la fois cliniquement et génétiquement hétérogène, il est subdivisé en différents sous-types définis selon la présence ou l'absence de symptômes additionnels à ceux mentionnés plus haut. Le type I se caractérise par un symptôme supplémentaire, qui est la dystopie canthorum, c'est-à-dire un écartement des yeux anormalement large. Le type II ne présente pas de symptômes additionnels. Les types I et II sont les plus fréquents. Le type III se manifeste en plus d'une dystopie canthorum et des anomalies musculosquelettiques des membres supérieurs. Et le type IV, aussi appelé syndrome de Waardenburg-Shah, qui a été décrit pour la première fois en 1981, combine des anomalies de pigmentation à un mégacôlon aganglionnaire (Pingault *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 1981). La coexistence du SW et de HSCR est particulièrement rare, avec une prévalence des deux conditions ensemble de 4 cas par million (Mahmoudi *et al.*, 2013). Le SW4 est lui-même subdivisé en sous-types selon l'atteinte intestinale. Tous les patients sont atteints de troubles de l'audition et d'anomalies pigmentaires mais : le type 4A, manifeste de la constipation; le type 4B, HSCR; le type 4C, de la constipation sévère liée à HSCR et des troubles neurologiques. Les troubles neurologiques incluent la neuropathie périphérique, un retard mental, l'ataxie cérébelleuse et la spasticité (Kawabata *et al.*, 1987; Touraine *et al.*, 2000).

Le diagnostic du SW repose sur l'examen clinique et de l'historique familial. Il existe cinq critères majeurs et cinq critères mineurs. Les critères majeurs incluent une surdité neurosensorielle, des anomalies pigmentaires de l'iris, une hypopigmentation des cheveux, la dystopie canthorum et un proche du premier degré ayant reçu un diagnostic du SW. Les critères mineurs sont l'hypopigmentation des yeux, une implantation pilaire dans la région inter sourcilière, une racine nasale large et un grisonnement prématûre des cheveux. Pour être diagnostiqué, le patient doit valider au moins 2 critères majeurs, ou bien 1 majeur et 1 mineur (Mahmoudi *et al.*, 2013). Chez les patients atteints du SW4, la présence d'un mégacôlon aganglionnaire doit être détectée comme précédemment indiqué.

Le SW est une maladie génétique héritée généralement de façon autosomique dominante, mais des cas récessifs ou à dominance incomplète ont été décrit dans la littérature (Zlotogora *et al.*, 1995). Différentes mutations sont impliquées, touchant des gènes appartenant aux réseaux de régulation du développement des CCN, notamment : *Pax3*, *Mitf*, *Sox10*, *Edn3*, *Ednrb* et *Snai 2* (Huang *et al.*, 2022). SW1 et SW3 sont principalement causés par des mutations de *Pax3* (Tassabehji *et al.*, 1992). SW2 présente une génétique complexe, mais différents cas ont été associés à des mutations de *Mitf*, *Ednrb* et *Snai2*. Le SW4 est lié à des mutations de *Edn3*, *Ednrb* et *Sox10*, impliqués aussi bien dans le développement du SNE que les

mélanocytes, ainsi que dans la pathogenèse de HSCR (Huang *et al.*, 2022). Le niveau d'expression d'*Edn3* et *Ednrb* est important dans la pathogenèse de SW4. Les substitutions, les délétions ou les mutations non-sens homozygotes mènent à la manifestation de symptômes, alors que les hétérozygotes ont peu de symptômes ou souffrent d'HSCR de façon isolée (Read et Newton, 1997). Concernant *Sox10*, plus de 30 mutation dominantes ont été identifiées, dont les formes non-sens et faux-sens sont les plus abondantes (Pingault *et al.*, 2010). Comme mentionné précédemment, SOX10 est un facteur de transcription impliqué dans la colonisation des CCN lors du développement du SNE. Il régule également le promoteur de *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) qui est un gène clé dans le développement et la survie postnatale des mélanocytes (Bondurand *et al.*, 2000). Au total, environ 50% des patients atteints du SW4 sont atteints de mutations dans *SOX10*, 20-30% dans *EDN3* ou *EDNRB*, tandis que 20-30% présentent des mutations non identifiées (Pingault *et al.*, 2010). À ce jour, il n'existe aucun traitement définitif du SW ; les prises en charge sont uniquement symptomatiques, telles que les prothèses ou implants cochléaires pour la surdité, et la chirurgie pour l'HSCR (Huang *et al.*, 2022).

1.3.3 Le modèle murin Nr2f1^{Spt/Spt}

En raison de l'importante similarité génétique, physiologique et développementale entre la souris et l'humain, l'utilisation de modèles murins transgéniques pour étudier des mécanismes physiopathologiques des maladies humaines comme HSCR ou du SW4, est particulièrement pertinente. De plus, il reste nécessaire d'identifier de nouveaux facteurs génétiques et de mieux caractériser les mécanismes moléculaires encore méconnus dans ces pathologies. Le laboratoire du Professeur Nicolas Pilon, a mis en place une approche innovante visant à identifier de nouveaux loci génétiques impliqués dans le développement des CCN. Cette stratégie repose sur l'utilisation de la pigmentation du pelage, directement liée à l'activité des mélanocytes dérivés des CCN. Chez des souris albinos porteuses d'une mutation inactivatrice de la tyrosinase (*Tyr*), enzyme essentielle à la production de mélanine, un mini-gène *Tyr* est introduit par transgénèse et s'insère aléatoirement dans le génome. L'inspection visuelle du pelage permet alors de repérer les événements d'insertion perturbant un locus clé pour la colonisation des CCN. Si cette insertion entraîne un sauvetage partiel de la pigmentation du pelage, caractérisé par une coloration hétérogène et incomplète du pelage, cela reflète un défaut de migration ou de survie des mélanocytes dans l'épiderme. Ce phénotype indique ainsi que le site d'insertion est localisé dans un locus important pour la colonisation des CCN. Parmi environ 200 lignées générées, six ont été identifiées comme présentant, en plus d'anomalies de pigmentation, divers phénotypes pathologiques associés (Pilon, 2016) (Figure 1.12).

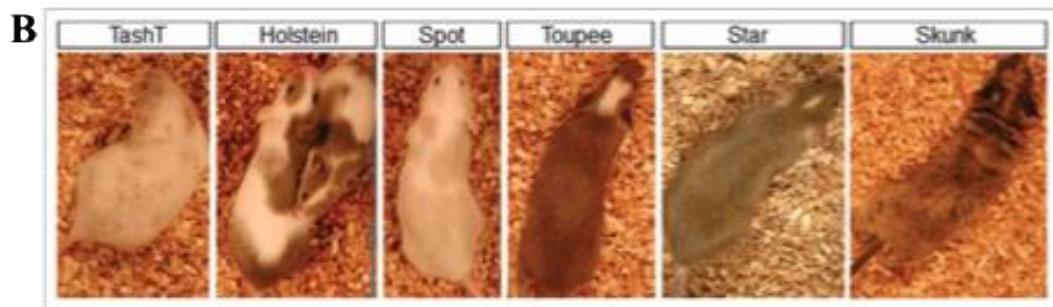
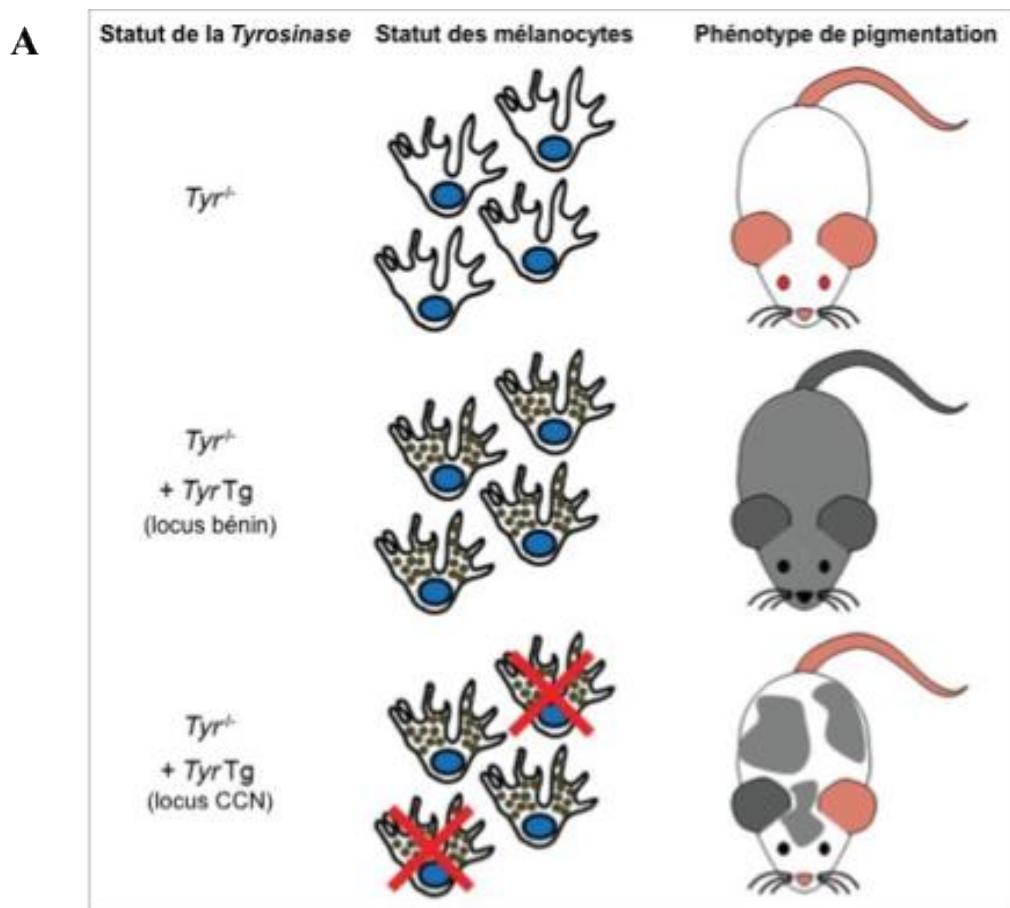


Figure 1.12 : Criblage génétique basé sur la pigmentation

(A) Représentation schématique de la stratégie de criblage génétique se basant sur la pigmentation du pelage. Les souris albinos sont dépigmentées dû à une mutation dans le gène codant pour la Tyrosinase. En réintroduisant le gène *Tyr* via transgenèse, cela permet de sauver le phénotype albinos. La pigmentation est non uniforme dans l'éventualité où l'insertion aléatoire se fait dans un locus important pour les CCN. (B) Lignées transgéniques obtenues en utilisant cette stratégie. Les animaux hétérozygotes présentent chacun des pigmentations non homogènes caractéristiques pour chaque lignée. Adapté de (Pilon, 2016)

Parmi ces lignées, les souris *Nr2fl*^{Spt/Spt}, porteuses de l'allèle Spot, présentent une insertion de *Tyr* sur le chromosome 13, dans la séquence du long ARN non codant *A830082K12Rik*, juxtaposé et antisens au gène *Nr2fl*. Cette mutagenèse insertionnelle a entraîné une délétion de 353pb et l'insertion de 130kb de séquence transgénique, provoquant le découplage d'une interaction longue distance entre un élément répresseur et le promoteur partagé de *Nr2fl* et *A830082K12Rik*. En résulte ainsi, la surexpression de *Nr2fl*, ainsi que des isoformes courtes du long ARN non codant, et une perte de son isoforme longue, spécifiquement dans les CCN dès E12.5. Cette insertion entraîne également une dérégulation secondaire de nombreux gènes, dont ceux codant pour des marqueurs gliaux (*Plp1*, *Gfap*, *S100 β* , *Fabp7*) qui sont surexprimés dans les CCNE des souris *Nr2fl*^{Spt/Spt} (Bergeron *et al.*, 2016).

Cette lignée murine récapitule le phénotype de SW4. Les souris hétérozygotes présentent un pelage non uniforme, marqué de larges taches de pigmentation gris clair, indiquant une migration mélanocytaire incomplète dans la peau. Les souris homozygotes, quant à elles, sont dépourvues de pigmentation, présentent un comportement de rotations hyperactives lié à des anomalies de l'oreille interne (absence de mélanocytes vestibulaires compromettant l'équilibre), une aganglionose du côlon distal ainsi qu'un mégacôlon touchant le côlon proximal et le cæcum. La sévérité du phénotype n'est pas influencée par le sexe. Une mortalité périnatale élevée est observée entre P1 et P2, dû à une connexion anormale du nerf spinal I et le nerf hypoglosse XII chez environ 70% des animaux, qui semble entraîner des difficultés de succion et de déglutition. Additionnellement, la comorbidité avec HSCR provoque une mortalité plus tardive dans la période postnatale, ce qui a pour conséquences un taux de survie des homozygotes de 28% après P20. Dans ce modèle, le mégacôlon aganglionnaire résulte d'une gliogenèse prématuée des CCN, qui empêche leur colonisation complète de la partie terminale de l'intestin. En effet, un délai de colonisation persistant est observable dès E11.5, accompagnée de l'expression anormale de S100 β dans le petit intestin proximal à E13.5 (Bergeron *et al.*, 2016) (Figure 1.13).

Après cette première caractérisation, une autre étude du laboratoire s'est concentrée sur l'impact de la surexpression de *Nr2fl* sur le développement mélanocytaire. Il s'est avéré que cette surexpression provoque une altération développementale des mélanoblastes migrant dorsolatéralement, qui au lieu de se différencier en mélanocytes, adoptent un destin PCS. De plus, les PCS migrant ventralement sont également affectés, puisqu'ils ne peuvent plus se différencier en mélanoblastes. Enfin, dans la région céphalique, les mélanocytes dérivés des PCS colonisent normalement la cochlée, tandis que les mélanocytes dérivés des CCN échouent à coloniser le vestibule (Bonnamour *et al.*, 2022). Ces résultats montrent ainsi que la

dérégulation de *Nr2f1* a un impact région-dépendant sur le destin cellulaire, modulant spécifiquement l'équilibre entre les lignages PCS et mélanoblastes.

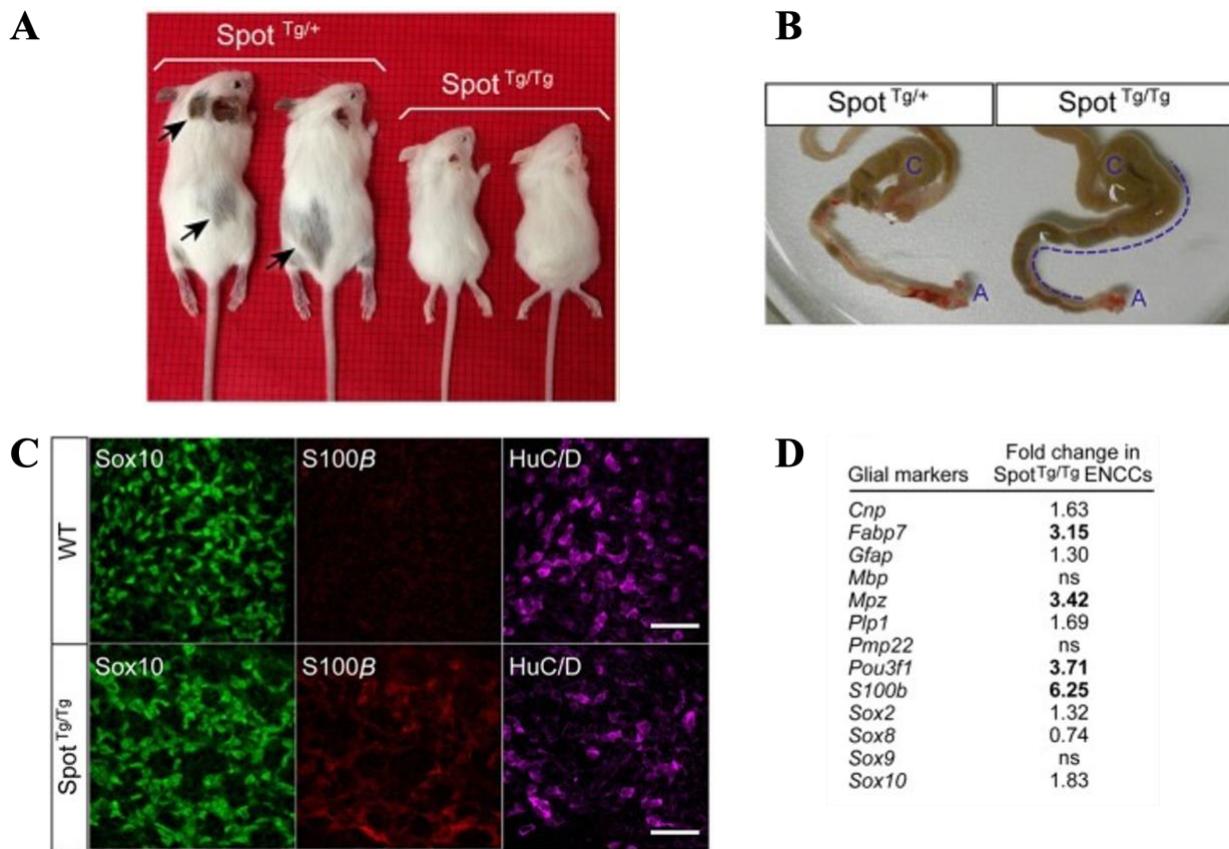


Figure 1.13 : Phénotype et atteinte gastrointestinale des souris *Nr2f1*^{Spt/Spt}

(A) Souris *Nr2f1*^{Spt/+} et *Nr2f1*^{Spt/Spt}, porteuses de l'allèle Spot, à P20. Les tâches de pigmentation ne sont visibles que chez les animaux hétérozygotes. (B) Intestins disséqués de souris *Nr2f1*^{Spt/+} et *Nr2f1*^{Spt/Spt} à P20. Les homozygotes manifestent des signes cliniques de mégacôlon, avec un blocage du côlon distal et une accumulation de matière fécale dans la partie antérieure. (C) Photos de microscopie confocale du petit intestin proximal d'embryons WT et *Nr2f1*^{Spt/Spt} à E13.5, montrant l'expression précoce du marqueur glial S100β chez les embryons *Nr2f1*^{Spt/Spt}. Barre d'échelle, 50 µm. (D) Augmentation de l'expression de nombreux marqueurs gliaux dans les CCN isolées d'embryon *Nr2f1*^{Spt/Spt} à E12.5. Adapté de (Bergeron *et al.*, 2016)

1.3.4 Nr2f1 et la gliogenèse

Le gène *Nr2f1*, aussi connu sous le nom de *Coup-tf1* pour Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor I, code un récepteur nucléaire de la superfamille des récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Ce récepteur est orphelin, son ligand n'ayant pas été identifié (Evans et Mangelsdorf, 2014; Weikum *et al.*, 2018). NR2F1 agit comme un facteur de transcription qui joue un rôle majeur dans le développement cortical du SNC, particulièrement chez les progéniteurs et les neurones immatures, où il coordonne la structure corticale et la neurogenèse (Bertacchi *et al.*, 2020; Faedo *et al.*, 2008). Avec son paralogue NR2F2, il est également participé aussi à la spécification gliale des progéniteurs du SNC (Naka *et al.*, 2008) et la différenciation des oligodendrocytes (Yamaguchi *et al.*, 2004). Ce gène est également impliqué dans l'atrophie optique de Bosch-Boonstra-Schaaf (BBSOA - Bosch-Boonstra-Schaff optic atrophy syndrome), une maladie autosomique dominante, provoquée par des mutations perte de fonction de *Nr2f1*. Ce syndrome se caractérise principalement par une atrophie du nerf optique associée à une déficience intellectuelle, mais les patients manifestent également un large spectre de symptômes dont un retard développemental global, des déficiences visuelles cérébrales, des défauts oculaires, des dysfonctions motrices, des altérations auditives et du langage (Bertacchi *et al.*, 2019).

L'implication de *Nr2f1* dans la gliogenèse entérique a été décrite pour la première fois par Bergeron *et al.* en 2016. Depuis, le mécanisme exact via lequel NR2F1 régule la gliogenèse et ces partenaires d'interaction n'ont pas encore été élucidés. Des résultats de ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) dans des cellules de Schwann ont mis en évidence un enrichissement de sites de liaison de NR2F1 et NR2F2 à proximité des sites de liaisons de SOX10, suggérant une co-régulation des gènes gliaux par NR2F1 et SOX10. De plus, l'inhibition de la traduction par siRNA ciblant *Nr2f1* et/ou *Nr2f2*, induit une diminution de l'expression des gènes régulant la myélinisation des nerfs périphériques par la cellules de Schwann, ce qui renforce l'hypothèse d'une action conjointe de NR2F1 et SOX10 (Lopez-Anido *et al.*, 2015). Des résultats préliminaires du laboratoire du Pr Nicolas Pilon, suggèrent une interaction fonctionnelle de SOX10 avec NR2F1 : d'une part transcriptionnelle, sur des gènes gliaux (essais luciférase), et d'autre part directe, par une interaction physique de SOX10 et NR2F1 dans le noyau des CCN (BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation)). Cependant, la ou les fonctions précises de NR2F1 dans le destin cellulaire des CCN et la gliogenèse entérique n'ont pas encore été élucidés.

1.4 Hypothèses et objectifs

Les CGE constituent une population cellulaire caractérisée par une importante hétérogénéité moléculaire, transcriptionnelle et fonctionnelle, qui peut également être décrite en se basant sur des critères topo-morphologiques. La classification topo-morphologique décrit ainsi chez l'adulte quatre principaux sous-types gliaux, conservés entre différentes espèces (dont l'humain et la souris), et distingués selon leur morphologie cellulaire et leur localisation au sein des plexus nerveux et des couches tissulaires intestinales. Cependant, une vaste zone d'ombre demeure concernant ces sous-types gliaux, notamment sur leur identité moléculaire et transcriptionnelle, leurs fonctions mais également leur diversification, ce qui constitue le processus développemental à l'origine de ces sous-types. De même, il est tout à fait méconnu si la diversification gliale pourrait être perturbée dans certaines neurocristopathies, notamment dans certains contextes dans lesquels la gliogenèse entérique embryonnaire est altérée. Il est ainsi nécessaire d'établir des bases fondamentales décrivant la diversité gliale dans divers contextes physiologiques et pathologiques, qui pourraient supporter le développement de solutions thérapeutiques.

L'objectif général de cette thèse est d'étudier la diversification des CGE en sous-types topo-morphologiques en conditions physiologiques, mais aussi pathologiques dans un modèle murin du SW4.

Pour répondre à cet objectif, cette thèse repose sur une revue de littérature publiée en 2023 dans *International Journal of Molecular Sciences*, placée en annexe, sur la thématique de la diversité, la multipotence et la plasticité des CGE. Puis, un article publié en 2024 et un autre soumis en 2025 dans *Frontiers in Neuroscience*, qui constituent le deuxième et le troisième chapitre.

PREMIER ARTICLE (*Frontiers in Neuroscience*, 2024) : étude en conditions physiologiques.

Bases de l'étude :

- Après la naissance, le tractus gastrointestinal et le SNE subissent d'importants changements morphologiques et fonctionnels (de Vries *et al.*, 2010).
- La période postnatale constitue une étape critique dans l'organisation du PM et du PSM, au cours de laquelle se structurent les composants des plexus (Cossais *et al.*, 2016).
- Les PCS contribuent à la neurogenèse entérique formant jusqu'à 20% des neurones du côlon, exprimant préférentiellement la Calretinin (Uesaka *et al.*, 2015).
- Ces PCS peuvent générer des CGE dans le contexte d'une thérapie régénérative du SNE pendant la période postnatale (Soret *et al.*, 2020).

Hypothèse 1.1 : l'émergence des sous-types topo-morphologiques de CGE se produit dans la période postnatale et de façon concomitante à la structuration morphologique des plexus et des tissus intestinaux.

Objectif spécifique 1.1 : caractériser la diversification gliale à différents temps postnataux (P1, P5, P10 et P20) dans différentes régions intestinales (iléon distal et côlon distal) par immunofluorescence.

Hypothèse 1.2 : les PCS contribuent à la gliogenèse entérique en conditions physiologiques, et participent à la diversité gliale comme source alternative de précurseurs par rapport aux CCN.

Objectif spécifique 1.2 : caractériser la contribution des PCS à la diversification gliale à différents temps postnataux (P1, P5, P10 et P20) dans différentes régions intestinales (iléon distal et côlon distal) par immunofluorescence via un système de traçage de lignage cellulaire.

DEUXIÈME ARTICLE (*Frontiers in Neuroscience*, 2025) : étude en condition pathologique.

Bases de l'étude :

- Chez le modèle murin $Nr2f1^{Spt/Spt}$ du SW4, la gliogenèse entérique est prématuée lors du développement embryonnaire, résultant en une colonisation incomplète des CCN dans la partie terminale de l'intestin et ainsi en la formation d'un mégacôlon aganglionnaire (Bergeron *et al.*, 2016).
- Des résultats préliminaires du laboratoire ont montré des altérations de la diversité gliale dans l'iléon des souriceaux $Nr2f1^{Spt/Spt}$.
- Dans d'autres modèles murins d'HSCR, des anomalies gliales, comme la modification du ratio neurone:glie et la densité gliale, dans la partie ganglionnaire ont été identifiées (Musser *et al.*, 2015).
- Des travaux publiés par le laboratoire ont montré que le destin cellulaire des PCS-mélanoblastes était altéré dans le modèle murin $Nr2f1^{Spt/Spt}$ (Bonnamour *et al.*, 2022).
- La contribution des PCS à la neurogenèse entérique est modifiée dans d'autres modèles murins de HSCR (Uesaka *et al.*, 2021).

Hypothèse 2.1 : la diversification gliale est altérée dans les zones ganglionnaires du modèle murin $Nr2f1^{Spt/Spt}$.

Objectif spécifique 2.1 : caractériser l'altération de la diversification gliale dans la lignée $Nr2fl^{Spt/Spt}$ à différents temps postnataux (P1, P5 et P15) dans une région intestinale ganglionnaire (iléon distal) par immunofluorescence.

Hypothèse 2.2 : la contribution postnatale des PCS est perturbée chez les souris $Nr2fl^{Spt/Spt}$.

Objectif spécifique 2.2 : caractériser l'altération de la contribution des PCS à la diversification gliale dans la lignée $Nr2fl^{Spt/Spt}$ à différents temps postnataux (P1, P5 et P15) dans une région intestinale ganglionnaire (iléon distal) par immunofluorescence via un système de traçage de lignage cellulaire.

CHAPITRE 2

ENTERIC GLIAL CELL DIVERSIFICATION IS INFLUENCED BY SPATIOTEMPORAL FACTORS AND SOURCE OF NEURAL PROGENITORS IN MICE

Marie A. Lefèvre^{1,2}, Zoé Godefroid^{1,2}, Rodolphe Soret^{1,2,*}, Nicolas Pilon^{1,2,3,*}.

¹Molecular Genetics of Development Laboratory, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal, QC, Canada

²Centre D'excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines-Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

³Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Edited by: Simone Battaglia, University of Bologna, Italy

Reviewed by: Nandor Nagy, Semmelweis University, Hungary ; Meenakshi Rao, Harvard Medical School, United States ; Hélène Boudin, INSERM U1235 The Enteric Nervous System in Gut and Brain Disorders (TENS), France.

✉*Correspondence: Rodolphe Soret, soret.rodolphe@uqam.ca

*Nicolas Pilon, pilon.nicolas@uqam.ca

PMCID: PMC11390640 PMID: 39268038

Frontiers in Neuroscience, 2024.

doi: 10.3389/fnins.2024.1392703

Contributions

Marie Lefèvre : Collecte et curation des données, Analyse formelle, Investigations, Visualisation, Rédaction – brouillon initial. Zoé Godefroid : Investigations (Figure 1 et 2), Validation, Rédaction – brouillon initial. Rodolphe Soret : Analyse formelle, Supervision, Visualisation, Rédaction – brouillon initial. Nicolas Pilon : Obtention des financements, Supervision, Rédaction – brouillon initial, Rédaction – relecture et révision

2.1 Résumé

Auparavant centrées principalement sur les neurones entériques, les études portant sur le système nerveux entérique (SNE) en conditions physiologiques et pathologiques s’élargissent désormais pour reconnaître le rôle tout aussi important joué par les cellules gliales entériques (CGE). À la mesure de la vaste gamme de fonctions gastro-intestinales qu’elles influencent, les CGE présentent une diversité considérable en termes de localisation, de morphologie, de profils moléculaires et d’attributs fonctionnels. Cependant, les mécanismes sous-jacents à cette diversification des CGE demeurent en grande partie inexplorés. Pour commencer à démêler les complexités mécanistiques de la diversité des CGE, la présente étude visait à examiner plus en détail les aspects spatio-temporels de cette diversité et à déterminer si les différentes sources de progéniteurs neuronaux entériques contribuent différemment à cette diversité. S’appuyant sur des critères topo-morphologiques établis pour classer les CGE en quatre sous-types principaux, nos analyses détaillées par immunofluorescence ont d’abord révélé que ces sous-types émergent séquentiellement au cours du développement postnatal précoce, de manière coordonnée avec les changements structurels qui surviennent dans le SNE. Combinées à des expériences de traçage génétique de lignée cellulaire, nos analyses ont ensuite mis en évidence que les progéniteurs neuronaux entériques dérivés de cellules de Schwann contribuent de manière fortement biaisée à certains sous-types topo-morphologiques des CGE. Pris ensemble, ces résultats offrent une base solide pour des recherches ultérieures sur les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant la diversité des CGE.

Mots clefs : traçage de lignage cellulaire; cellules gliales entériques; système nerveux entérique; myentérique plexus; développement postnatal; précurseurs de cellules de Schwann; plexus sous-muqueux; sous-types topo-morphologiques.

2.2 Abstract

Previously focused primarily on enteric neurons, studies of the enteric nervous system (ENS) in both health and disease are now broadening to recognize the equally significant role played by enteric glial cells (EGCs). Commensurate to the vast array of gastrointestinal functions they influence, EGCs exhibit considerable diversity in terms of location, morphology, molecular profiles, and functional attributes. However, the mechanisms underlying this diversification of EGCs remain largely unexplored. To begin unraveling the mechanistic complexities of EGC diversity, the current study aimed to examine its spatiotemporal aspects in greater detail, and to assess whether the various sources of enteric neural progenitors contribute differentially to this diversity. Based on established topo-morphological criteria for categorizing EGCs into four main subtypes, our detailed immunofluorescence analyses first revealed that these subtypes emerge sequentially during early postnatal development, in a coordinated manner with the structural changes that occur in the ENS. When combined with genetic cell lineage tracing experiments, our analyses then uncovered a strongly biased contribution by Schwann cell-derived enteric neural progenitors to particular topo-morphological subtypes of EGCs. Taken together, these findings provide a robust foundation for further investigations into the molecular and cellular mechanisms governing EGC diversity.

Keywords: cell lineage tracing; enteric glial cells; enteric nervous system; myenteric plexus; postnatal development; schwann cell precursors; submucosal plexus; topo-morphological subtypes.

2.3 Introduction

The enteric nervous system (ENS) is an integrated neural network that extends throughout the gastrointestinal tract. In mammals, the ENS is mainly subdivided into the myenteric and submucosal plexuses, each consisting of interconnected ganglia containing both enteric neurons and enteric glial cells (EGCs). Each plexus serves overlapping yet distinct functions (Furness, 2012; Schneider *et al.*, 2019; Sharkey et Mawe, 2023). For instance, the myenteric plexus, nestled between the longitudinal and circular smooth muscle layers, is chiefly responsible for orchestrating complex patterns of smooth muscle contraction/relaxation to regulate peristalsis. In contrast, the submucosal plexus, positioned between the circular smooth muscle layer and the mucosal lamina propria, has the unique capability to interact with epithelial cells to regulate selective permeability. That said, both plexuses share a similar ability to functionally interact with the gut-resident immune system (Progatzky et Pachnis, 2022; Yoo et Mazmanian, 2017).

Current state of knowledge strongly suggests that many roles of the ENS are in fact mainly fulfilled by EGCs, rather than enteric neurons (Boesmans *et al.*, 2022; Lefevre *et al.*, 2023; Rosenberg et Rao, 2021; Seguella et Gulbransen, 2021). Notable examples include the regulation of gastrointestinal immunity (Progatzky *et al.*, 2021) and epithelial integrity (Baghdadi *et al.*, 2022), where EGCs can detect damages and release appropriate pro-resolution substances (Baghdadi et Kim, 2023; Lefevre *et al.*, 2023; Progatzky et Pachnis, 2022; Seguella et Gulbransen, 2021). In addition, EGCs are not only essential for providing trophic support to enteric neurons, but even have the potential to differentiate into enteric neurons themselves (Belkind-Gerson *et al.*, 2017; Joseph *et al.*, 2011; Laranjeira *et al.*, 2011; McCallum *et al.*, 2020). A prevalent view in the field is that all these different roles played by EGCs are distributed across different EGC subtypes. However, there is currently no clear consensus on how to classify these EGC subtypes. Depending on the criteria used, between three to nine subtypes of EGCs have been described (Lefevre *et al.*, 2023). The more widely used classification system is based on topo-morphological criteria established from the study of adult rodents (Boesmans *et al.*, 2015; Charrier et Pilon, 2017; Gulbransen et Sharkey, 2012; Hanani et Reichenbach, 1994), also validated in zebrafish (McCallum *et al.*, 2020). This classification system allows to categorize EGCs into four main subtypes, each with a specific morphology linked to a particular location: highly branched Type I in ganglia, fibrous Type II in interganglionic fibers, multipolar

unbranched Type III outside ganglia and interganglionic fibers, and bipolar Type IV deeper in muscles. Yet, how these (or any other) EGC subtypes are generated is currently elusive.

An important limitation for the study of EGC diversity is that we do not really know when diversification occurs. The early postnatal period is presumably critical, when both plexuses of the ENS must adapt to structural changes in the bowel wall. These structural changes might be a driving force for EGC diversification, at least based on topological criteria. Indeed, both the size and thickness of the bowel undergo significant changes during this period, implying that both plexuses must expand and transform in a coordinated manner to ensure various vital gastrointestinal functions (Roberts *et al.*, 2007). In the myenteric plexus, this is notably reflected by the morphological transformation from dense juxtaposed groups of cells into individual and sparse ganglia, a process also accompanied by the expansion of both glial (Cossais *et al.*, 2016) and neuronal (Liu, M. T. *et al.*, 2009) cell populations as well as by changes in the proportion of cholinergic and nitrergic neuron subtypes (de Vries *et al.*, 2010). Although much less studied, similar maturation-associated changes have also been reported in the submucosal plexus (Young *et al.*, Ciampoli, 1998).

Another potential source of EGC diversity might reside in the different origins of ENS progenitors, which are mainly derived either directly from neural crest cells or indirectly via neural crest-derived Schwann cell precursor (SCPs) (Pilon, 2021). The contribution of SCPs to the pool of enteric neurons is relatively well documented, with multiple reports supporting the existence of SCP-derived neurons in evolutionary distant species like the lamprey (Green *et al.*, 2017), chicken (Espinosa-Medina *et al.*, 2017), zebrafish (El-Nachef *et al.*, 2020; Kuil *et al.*, 2023), mouse (Soret *et al.*, 2020; Uesaka *et al.*, 2015; Uesaka *et al.*, 2021) and human (Woods *et al.*, 2021). In contrast, although studies in both normal (Uesaka *et al.*, 2015) and ENS-deficient (Soret *et al.*, 2020; Uesaka *et al.*, 2021) mice strongly suggest that SCPs can give rise to EGCs as well, this contribution has not been systematically assessed so far. In particular, the possibility that SCPs preferentially contribute to certain subtypes of EGCs, as they do for the Calretinin-positive subtype of enteric neurons in healthy mice (Uesaka *et al.*, 2015), is unknown.

In the current study, we carefully analyzed the emergence of EGC diversity from a spatiotemporal perspective in two segments of the murine gastrointestinal tract (distal ileum and distal colon), while also assessing the specific contribution of SCPs to the EGC pool. Our immunofluorescence analyses revealed asynchronous emergence of the four main topo-morphological EGC subtypes during the early postnatal period, with different order of appearance along the radial axis (myenteric plexus *vs* submucosal plexus). Our genetic cell lineage tracing experiments further showed a greater contribution of SCPs to the EGC pool

in the colon than in the ileum, as previously reported for enteric neurons. Most interestingly, this contribution was also found not to be equal among the four topo-morphological subtypes, with a bias for Type IV in the myenteric plexus / circular muscle and a bias for Type II in the submucosal plexus. These findings provide a stepping stone for a better understanding of EGC diversification, thereby also opening new avenues for exploring functional diversity within the ENS.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Mice

Wild-type FVB mice [FVB/NCrl; Strain code 207] were obtained from Charles River Laboratory, whereas the *Dhh*-Cre line [Jax stock #012929; FVB(Cg)-*Tg(Dhh-cre)1Mehr/J*] was obtained from the Jackson Laboratory. The *Rosa26*^{[FlxedSTOP]YFP} line [*Gt(ROSA)26Sor*^{tm1(EYFP)Cos}] was kindly directly provided by Dr. Frank Costantini (Columbia University). Both *Dhh*-Cre and *Rosa26*^{[FlxedSTOP]YFP} mice were maintained on the FVB background and genotyped by standard PCR using primers listed in Table S1. All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the institutional committee (CIPA #992) of the Université du Québec à Montréal (UQAM). Euthanasia was performed either by decapitation for mice aged between postnatal day (P) 1 to P10, or by exposure to carbon dioxide (CO₂) following isoflurane anesthesia for P20 mice. Animals from both sexes were included for each time point (see supplemental Data Sheet 1 for more details).

2.4.2 Sample collection and processing

After euthanasia, mice were pinned to a styrofoam slab to facilitate the removal of the skin and peritoneum, providing access to the gastrointestinal system. The small intestine and colon were then collected and kept in ice-cold 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline) throughout the duration of the dissection. For both segments, we used only the most distal quarter, either just upstream of the cecum (distal ileum) or the anus (distal colon). Each sample was cut longitudinally along the mesentery, extensively washed in 1X PBS to remove stool, and pinned with mucosa side up onto Sylgard-coated (Dow Corning, Freeland, MI) Petri dishes. Pinned tissues were subsequently fixed overnight in 4% paraformaldehyde diluted in 1X PBS, followed by three washes of 10 min in 1X PBS. Tissues from P20 mice were further carefully microdissected to peel off the mucosal layer (including the submucosal plexus) while also preserving the muscle layers (including the myenteric plexus). All samples were stored in 1X PBS at 4°C prior to whole-mount immunofluorescence staining.

2.4.3 Whole-mount immunofluorescence staining

Ileum and colon samples were initially permeabilized for 2 hours in blocking solution (5% Fetal Bovine Serum and 1% Triton-X100 in 1X PBS), followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies diluted in same blocking solution. After three washes of 10 min in 1X PBS, samples were then incubated with relevant secondary antibodies diluted in blocking solution for 1h30, followed by three additional washes of 10 min in 1X PBS. During the second wash, samples were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in 1X PBS. The specific antibodies used, and their dilution factors are listed in Table S2. To enable the observation of plexuses via confocal microscopy, the stained tissues were mounted between two 24 x 50 mm glass coverslips in 100% Glycerol.

2.4.4 Imaging and data analysis

All immunofluorescence images were acquired using a Nikon A1 confocal microscope with Plan Fluor 20x/0.75 MImm and Plan Apo λ 60x/1.40 objectives. For each biological replicate, between 3 to 10 representative images were acquired, and then analyzed using the ImageJ software. EGC subtypes were manually quantified using the "Cell Counter" plugin, based on the location of SOX10+ cells and/or morphology of S100 β + cells (Figs.S2.1-2.3 and Movies S1-2). EGC proportions were calculated by including all relevant EGC subtypes in the total count (Type I to IV in the myenteric plexus / circular muscle layer; Type I to III in the submucosal plexus). The surface area of ganglia, extraganglionic space and interganglionic fibers were manually delineated and measured using the "freehand selections" tool, as shown in Fig.S2.1C.

2.4.5 Statistics

Each experiment was performed using 3-4 biological replicates, and either 3-5 (for myenteric plexus / circular muscle) or 6-10 (for submucosal plexus) fields of view per replicate (see supplemental Data Sheet 1 for detailed information about each replicate, including sex and number of counted cells). For quantitative analysis, data are expressed as the mean \pm standard deviation (SD), with the value of each imaging field also represented by a dot. Based on these single values, statistical significance of differences between groups was determined in GraphPad Prism 9.5.1, using either two-tailed Welch's *t*-tests (when comparing two groups) or One-Way/Two-Way ANOVA with Tukey's multiple comparison tests (when comparing more than two groups). Tests used are indicated in figure legends. Data were considered statistically significant when the *P*-value was less than 0.05.

2.5 Results

2.5.1 Topo-morphological subtypes of EGCs emerge sequentially during postnatal maturation of the myenteric plexus.

To gain insight about the process of EGC diversification, we first analyzed the appearance of the four main topo-morphological subtypes of EGCs in the myenteric plexus and circular muscle of wild-type FVB mice. Using whole-mount immunostaining, we studied four time points (P1, P5, P10 and P20) spanning the postnatal period before weaning. The longitudinal muscle layer was excluded from this analysis because of interference from the juxtaposed serosa, which gave high background signal in immunofluorescence staining. Staining of EGCs and neuronal networks was performed using antibodies against SOX10 and bIII-Tubulin, respectively. SOX10 staining is great for cell counting, being also generally sufficient for identifying EGC subtypes based on topological criteria only (Fig.S2.1A and Movies S1-2) – as the unique morphology of each subtype is linked to a specific location, along both the x/y plane and the z-axis (Boesmans *et al.*, 2015; Charrier et Pilon, 2017; Gulbransen et Sharkey, 2012; Hanani et Reichenbach, 1994). Notably, location along the z-axis is especially useful for distinguishing Type III from Type IV EGCs, as both subtypes are clearly not in the same plane (Fig.S2.1A and Movies S1-2). That said, we also co-stained all tissues for S100 β to enable definitive identification of EGC subtypes based on gross morphological criteria as well. Although global S100 β staining is not as good as sparse labeling approaches for revealing morphological details of EGCs (Boesmans *et al.*, 2015; Hanani et Reichenbach, 1994; Rao *et al.*, 2015), it nonetheless often proved to be useful for distinguishing between multipolar Type I and elongated Type II EGCs (from P5 onwards), when Type II EGCs are at the border of ganglia and oriented toward interganglionic fibers (Fig.S2.1B). Interestingly, our S100 β staining data further revealed that each EGC subtype within the myenteric plexus / circular muscle gradually acquires its definitive gross morphological characteristics between P1 and P20 (Fig.S2.2). For the sake of simplicity, detailed S100 β data are however not shown in the main figures. Given that as little as 2-6% of all SOX10+ cells from the myenteric plexus / circular muscle are negative for S100 β during the investigated period (Table 2.1), we reasoned that the impact of this decision on our estimates of the relative proportions of EGC subtypes would be minimal.

At P1, the vast majority of SOX10+ cells (>85%) can be classified as Type I EGCs, in both the distal ileum (Fig.2.1A-D) and the distal colon (Fig.2.2A-D). Most of the remaining EGCs fall into the Type II category (8-12%), while the other EGC subtypes are either marginally detected (2% for Type III) or absent (Type IV) in both bowel segments at this stage (Figs.2.1A-D and 2.2A-D). At P5, the proportions of Type III and Type IV EGCs are both markedly increased, with a steeper rise in Type III in the distal ileum (Fig.2.1A-D) and Type IV in the distal colon (Fig.2.2A-D). These increased proportions of Type III and Type IV are

mostly made at the expense of Type I EGCs, while the proportion of Type II EGCs remains relatively stable in both bowel segments (Figs.2.1A-D and 2.2A-D). The pool of Type III and Type IV EGCs continue to grow at P10 and P20, with asymmetric patterns favoring Type IV in the distal ileum (Fig.2.1A-D) or Type III in the distal colon (Fig.2.2A-D). As the proportion of Type II remains stable at all analyzed time points, this expansion of the pool of Type III and Type IV EGCs continues to be made at the expense of Type I EGCs in both bowel segments. Nonetheless, Type I EGCs are still the most common subtype, representing about half ($49 \pm 10\%$ in distal ileum; $45 \pm 10\%$ in distal colon) of all EGCs at P20 (Figs.2.1A-D and 2.2A-D). At this stage, Type III ($20 \pm 6\%$ in distal ileum; $20 \pm 5\%$ in distal colon) and Type IV ($17 \pm 3\%$ in distal ileum; $21 \pm 8\%$ in distal colon) EGCs are now equally represented, both outnumbering Type II EGCs ($14 \pm 5\%$ in distal ileum; $14 \pm 6\%$ in distal colon) (Figs.2.1A-D and 2.2A-D).

We next verified the possibility that the sequential appearance of the four topo-morphological subtypes of EGCs described above could be related to structural changes that occur in the bowel wall between P1 and P20. To this end, we carefully measured the surface area of ganglia, extraganglionic space, and interganglionic fibers as well as the thickness of the circular muscle layer (Fig.S2.1C), in all samples used for EGC subtype quantification in both the distal ileum (Fig.2.1E) and distal colon (Fig.2.2E). In accordance with the observed loosening of the connections between myenteric ganglia in both bowel segments, these analyses revealed a significant stage-dependant decrease in ganglionic surface area accompanied by a commensurate increase in extraganglionic surface area (Figs.2.1E and 2.2E). When analyzed as a function of EGC subtype proportions in corresponding samples, these structural changes are strongly correlated with the proportions of Type I EGCs and Type III EGCs, respectively (Figs.2.1F and 2.2F). The surface area of interganglionic fibers was not found to vary much overall between P1 and P20 (Figs.2.1E and 2.2E), similar to the proportion of Type II EGCs (Figs.2.1D and 2.2D), but both parameters are nonetheless again positively correlated when analyzed as a function of each other in each sample (Figs.2.1F and 2.2F). Lastly, we noted that the thickness of the circular muscle layer generally increases with age in both bowel segments, peaking at P10 and then slightly decreasing at P20. However, this increase was found to be delayed in the distal ileum compared to the distal colon, being suddenly detectable at P10 and P5, respectively (Figs.2.1E and 2.2E). Remarkably, this particular kinetics mimics the abrupt increase in the proportion of Type IV EGCs detected in each bowel segment, hence resulting in a positive correlation once again (Figs.2.1F and 2.2F).

From this systematic characterization of the maturing myenteric plexus / circular muscle, we can thus conclude that the four topo-morphological subtypes of EGCs appear in numerical order, from Type I/II (co-occurring) to Type IV, regardless of the bowel segment examined. Moreover, our correlation data strongly

support the notion that structural changes in the early postnatal bowel, including within the ENS, have a profound influence on the relative proportions of these four EGC subtypes.

2.5.2 Topo-morphological subtypes of EGCs emerge sequentially during postnatal maturation of the submucosal plexus, but in a different order compared to the myenteric plexus.

To complement our analyses of the myenteric plexus / circular muscle, we then turned to the submucosal plexus (largely excluding the mucosa), using the exact same experimental design as described above. Here, DAPI staining (in conjunction with β III-Tubulin staining) proved to be useful for delineating the tiny submucosal ganglia, based on the round nucleus of neurons (Fig.S2.3). We also found that the overlap between SOX10 and S100 β stainings is much lower here than in the myenteric plexus at P1 (Table 2.1), but we validated that proportions of EGC subtypes are nonetheless very similar when using combined SOX10-S100 β data instead of SOX10 data alone at both P1 (ileum) and P5 (colon) (Fig.S2.4). Of note, S100 β data further revealed that acquisition of definitive gross morphological attributes is delayed in the submucosal plexus (Fig.S2.2B) compared to the myenteric plexus (Fig.S2.2A).

Our detailed SOX10 immunofluorescence analyses again revealed the sequential appearance of EGC subtypes between P1 and P20, but not in the same order as in the myenteric plexus and with more pronounced regional differences between distal ileum (Fig.2.3A-C) and distal colon (Fig.2.4A-C). At P1, Type II EGCs are clearly predominating in the submucosal plexus, being even virtually exclusive in the distal colon (Fig.2.4A-C). This pattern is inversely reflected in the detection of Type I EGCs, which are present in the distal ileum at P1 (Fig.2.3A-C) but are not detected until P5 in the distal colon (Fig.2.4A-C). This population of Type I EGCs then generally grows over time in both bowel segments (Fig.2.3A-C and Fig.2.4A-C), until eventually outnumbering Type II EGCs in the distal ileum at P20 ($49 \pm 13\%$ of Type I vs $38 \pm 14\%$ of Type II), but not in the distal colon where Type II remains the most common subtype at this stage as well ($36 \pm 15\%$ of Type I vs $58 \pm 14\%$ of Type II). In both bowel segments (Figs.2.3A-C and 2.4A-C), Type III EGCs are not detected at P1, then forming a relatively marginal population until P20, at which stage they are more numerous in the distal ileum ($13 \pm 6\%$) than in the distal colon ($6\% \pm 6\%$). However, it is important to bear in mind that these proportions only take into account Type III EGCs close to the submucosal plexus (a.k.a. Type III_[SMP]), and not those located deeper in villi (a.k.a. Type III_[mucosa]), which are difficult to visualize along the z-axis after whole-mount staining (as performed in the current study).

Comparison with morphometric parameters of the submucosal plexus again revealed a robust correlation between the surface area occupied by ENS ganglia and the proportion of Type I EGCs, in each sample from the distal ileum (Fig.2.3D-E) and distal colon (Fig.2.4D-E). Yet, at the difference of the myenteric plexus,

where the ganglionic surface area decreases between P1 and P20 in both bowel segments (Figs.2.1E and 2.2E), the corresponding surface area in the submucosal plexus was found to generally increase over time (Figs.2.3D and 2.4D) – in line with the notion that the submucosal plexus initially develops via inward cell migration from the myenteric plexus (Lasrado *et al.*, 2017; McKeown *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2015). Accordingly, the surface area of the extraganglionic space, which markedly increases over time in the myenteric plexus (Figs.2.1E and 2.2E), was here found to slightly decrease in the submucosal plexus from P1 onwards (Figs.2.3D and 2.4D). Despite this difference between plexuses, a positive correlation can again be observed when the extraganglionic surface area is analyzed as a function of the proportion of Type III_[SMP] EGCs in each sample from both bowel segments (Figs.2.3E and 2.4E). This correlation is however weaker in the distal colon, where fewer Type III_[SMP] EGCs were detected. A more striking regional difference was noted for the surface area occupied by interganglionic submucosal nerves between P1 and P20, resulting in a robust stage-dependent decrease in the distal ileum (Fig.2.3D) and, conversely, a modest stage-dependent increase in the distal colon (Fig.2.4D). Nonetheless, a positive correlation with the proportion of Type II EGCs can once again be noted in both bowel segments (Figs.2.3E and 2.4E), this correlation being again weaker in the distal colon.

In sum, our immunofluorescence data indicate that EGC diversification based on topo-morphological criteria takes a different path in the submucosal plexus, with Type II EGCs appearing first, followed by Type I and Type III, respectively. Also, our correlation data again support a model whereby EGC diversification is generally impacted by structural changes in the ENS.

2.5.3 SCPs preferentially contribute to specific topo-morphological EGC subtypes, which vary depending of bowel segment.

To evaluate the specific contribution of SCPs to enteric gliogenesis during early postnatal development, we used the same genetic cell lineage tracing system as previously used to identify SCP derivatives in the bowel (Soret *et al.*, 2020) and the inner ear (Bonnamour *et al.*, 2021), comprising the transgenic *Dhh-Cre* driver (Jaegle *et al.*, 2003) and the *Rosa26^{FloxedSTOP}YFP* reporter allele (Srinivas *et al.*, 2001). When ENS progenitors directly derived from neural crest cells have just completed their colonization of the developing bowel (i.e., at embryonic day 14.5), this system specifically labels a subset of SOX10+ SCPs on mesentery-associated nerves, and none of the SOX10+ ENS cells already present in the ileum and colon (Fig.S2.5). A similar conclusion was previously drawn using the same Cre driver with a different Cre reporter allele, and this study further reported that SCPs starts to colonize the developing bowel a few days later, just before birth (Uesaka *et al.*, 2015). As also reported in this prior work focused on enteric neurogenesis (Uesaka *et al.*, 2015), our detailed immunofluorescence analyses revealed that the contribution of YFP+ SCPs to the

general pool of ENS cells after birth is much greater in the colon than in the ileum, at all stages examined between P1 and P20. As evidenced in the myenteric plexus at P5 (Fig.2.5A-B) we further found that this contribution is unevenly distributed, being apparently more extensive in the vicinity of extrinsic nerves that constitute the entry point for SCPs (see inset in Fig.2.5B). This patchy distribution led to widely distributed values in our global quantitative analysis of SCP-derived EGCs at P20 (Fig.2.5C). Interestingly, this analysis nonetheless highlighted the fact that the SCP contribution is also generally lower in the myenteric plexus / circular muscle than in the submucosal plexus, in both bowel segments (Fig.2.5C).

When analyzed as a function of topo-morphological subtypes, our immunofluorescence data then revealed that SCPs can contribute to every EGC subtype from both plexuses, as notably shown in the colon at P20 (Fig.2.5D-F). However, it is important to note that the final SCP contribution at P20 is clearly biased to particular EGC subtypes in a plexus-specific manner, favoring EGC Type IV in the myenteric plexus / circular muscle (40-53% of all SCP-derived EGCs; Figs.2.6A-B and S2.6A-B) and Type II in the submucosal plexus (58-67% of all SCP-derived EGCs; Fig.2.6C-D and S2.6C-D), in both bowel segments. Each bias seems to be established in accordance with the kinetics of appearance of their corresponding EGC subtype between P1 and P20, with the Type IV bias in the myenteric plexus / circular muscle (see Fig.2.6A-B vs Figs.2.1C-2.2C) appearing in a delayed manner relative to the Type II bias in the submucosal plexus (see Fig.2.6C-D vs Figs.2.3C-2.4C). Type I EGCs in the myenteric plexus / circular muscle from the distal colon initially constitute the highest contribution of SCPs, but this contribution then markedly decreases to ultimately stabilize around 26-32% in all locations at P20 (Figs.2.6 and S2.6). Type III EGCs constitute the lowest contribution overall, representing only 1-16% of SCP-derived EGCs at P20 (Figs.2.6 and S2.6). In conclusion, the SCP contribution to the EGC pool is not equal, being regionally different according to both the longitudinal (ileum vs colon) and the radial (myenteric plexus / muscle vs submucosal plexus) axes of the bowel.

2.6 Discussion

In this study, we investigated EGC diversification during the postnatal maturation of the myenteric and submucosal plexuses in both the distal ileum and distal colon. Combined with cell lineage tracing studies, our quantitative analyses highlighted important regional differences in the proportions and origins of the different topo-morphological subtypes of EGCs. That said, it is necessary to interpret these relative proportions for what they are, that is an estimate – not definitive exact values. Using SOX10 staining data alone had the potential disadvantage of including postnatal ENS progenitors in our calculations (Bondurand *et al.*, 2003), although this possibility must also be considered with caution as the distinction between *bona fide* ENS progenitors and neurogenic EGCs becomes increasingly blurred (Guyer *et al.*, 2023). The

alternative of systematically using combined SOX10-S100 β staining data for these calculations might have yielded slightly different proportions (Fig.S2.4), but these modest differences would not have changed our general conclusions. Therefore, regardless of precise values, we expect that the new insights provided by our work will pave the way for more comprehensive studies of the ENS in health and disease, as discussed below.

At P20 (*i.e.*, at the end of postnatal maturation), there is no difference between the distal ileum and distal colon in terms of proportions of the four topo-morphological EGC subtypes in the myenteric plexus / circular muscle, with Type I EGCs clearly predominating in both segments. Yet, a difference was noted in the kinetics of expansion of Type III and Type IV pools during earlier stages, with sudden increases of Type III in the ileum and Type IV in the colon, the proportions of both then remaining stable over time. More striking differences can be noted when comparing myenteric and submucosal plexuses in general, with Type II EGCs being much more frequent in the submucosal plexus. In this case, there is also a notable regional difference in that Type II EGCs even outnumber Type I EGCs specifically in the distal colon. When also integrated with the structural changes that occur in the bowel wall, all these complex spatiotemporal differences suggest that Type I and II EGCs from the myenteric plexus might give rise to the other topo-morphological subtypes in the myenteric plexus (via lateral and short radial migration) and submucosal plexus (via longer inward migration). Newcomer Type II EGCs in the submucosal plexus might then also contribute to generate EGC diversity as well, by acting as a local source of Type I and Type III EGCs. Testing these hierarchical models will be technically challenging in mice, although not impossible by combining genetic cell lineage tracing (using a tamoxifen-inducible *Sox10-Cre* driver for instance) (Deal *et al.*, 2021) with live imaging of bowel explants. This question might in fact be easier to address in the more imaging-friendly zebrafish, in which all topo-morphological subtypes of EGCs have also been described (McCallum *et al.*, 2020). An important related objective would be to identify and understand the signaling pathways involved in the directed migration of EGC subtypes. The Netrin/DCC pathway is a prime candidate for the control of radial migration (Jiang *et al.*, 2003), but most likely not the only one. Knowing which pathways are involved and how they work would be especially useful for devising new or improved ENS therapies based on *in situ* stimulation with exogenous growth factors (Pilon, 2021; Soret *et al.*, 2021; Soret *et al.*, 2020) or transplantation of genetically modified ENS progenitors (Mueller, J. L. *et al.*, 2024).

Beyond spatiotemporal considerations, we found that the different types of ENS progenitors can also be a significant source of EGC diversity. Indeed, although SCPs have the potential to generate all topo-morphological subtypes of EGCs, they have a marked preference for differentiating into Type IV in the myenteric plexus / circular muscle and into Type II in the submucosal plexus. By extension, these data thus

indicate that neural crest-derived ENS progenitors are by far the main source of Type I and Type III EGCs. This discovery is reminiscent of the biased origin of fibrous vs protoplasmic astrocytes in the central nervous system, where fibrous astrocytes are mainly derived from subventricular neural progenitors whereas protoplasmic astrocytes are rather preferentially derived from radial glia (Sovrea et Bosca, 2013). These different developmental pathways are believed to also impact the transcriptional signature and hence the function of astrocyte subtypes (Tabata, 2015). Whether this is also the case for SCP-derived EGCs will definitely be an exciting question to address in future work. In this regard, a previously published bulk RNA-seq analysis of *Pip1-GFP*⁺ EGCs suggests that molecular traces of an SCP origin might be present in some EGCs (Rao et al., 2015). However, a firm conclusion cannot be drawn without multi-marker staining of gastrointestinal tissues, and our preliminary investigations along these lines were not successful for *Mpz* – one of the candidate SCP marker gene identified in the previous bulk RNA-seq experiment (Rao et al., 2015). Using immunofluorescence, we failed to detect the corresponding protein in SCP-derived EGCs, while the same antibody works well for labeling sciatic nerve-associated Schwann cells (Fig.S2.7). This question of whether there is some kind of connection between topo-morphological and transcriptional subtypes of EGCs is certainly of great interest to the field (Lefevre et al., 2023), as notably highlighted in some studies recently posted as preprints (Majd et al., 2022; Windster et al., 2023). With the identification of subtype-specific markers will come the possibility to precisely evaluate the *in vivo* functional importance of specific EGC subtypes via Cre/Lox-induced cell ablation with diphtheria toxin-expressing reporters, as previously done for larger populations of EGCs (Baghdadi et al., 2022; Rao et al., 2017).

Regardless of where future research leads us, the new knowledge gained from the current study is already particularly important for all studies dealing with ENS regeneration (Pilon, 2021). Any project in this regard should now consider verifying the proper re-establishment of EGC subtypes in complementary proportions, as this is most likely essential for the normal functioning of the regenerated ENS. Given that EGC diversification is greatly influenced by the origin of ENS progenitors, this is also a call for using mixtures of different types of ENS progenitors in cell transplantation-based approaches. Moreover, the fact that we now know the relative proportions of the different topo-morphological EGC subtypes during postnatal maturation of the ENS (in both the myenteric and the submucosal plexus from two bowel segments) will allow to verify the physiological status of the gastrointestinal tract in health and disease with a much higher degree of precision.

2.7 Conflict of Interest

RS and NP are co-founders of the biotech company Neurenati Therapeutics, which had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

2.8 Author Contributions

Conceived and Supervised the study: RS and NP. Designed the experiments: MAL, RS and NP. Performed the experiments: MAL and ZG. Analyzed the data: MAL, RS and NP. Wrote the paper: MAL (original draft), RS (review), and NP (review and editing). All authors read and approved the final manuscript.

2.9 Funding

This work was funded by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (#RGPIN-2019-07076) to NP.

2.10 Acknowledgments

The authors would like to thank the Cellular analyses and Imaging core (CERMO-FC, UQAM) for assistance with confocal imaging, and Werend Boesmans for the recommendation of goat SOX10 antibody.

2.11 Data availability Statement

All relevant data are within the manuscript and its Supplementary Material files.

2.12 Tables and figures

	<u>SOX10+ S100β+ cells (%)</u>			
	total SOX10+ cells			
	Ileum MP	Ileum SMP	Colon MP	Colon SMP
P1	93.5 ± 4.2	83.2 ± 12.4	94.0 ± 1.7	78.8 ± 11.9
P20	97.0 ± 3.5	96.2 ± 6.2	97.9 ± 1.8	97.5 ± 3.9

Table 2.1 : Percentage overlap between SOX10 and S100 β staining.

GENE	SENSE PRIMER	ANTISENSE PRIMER

Rosa26-YFP	5'CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC'	YFP: 5'TGCGCCCTACAGATCCCTTAATTAA3' WT: 5'CCAGATGACTACCTATCCTCCCA3'
Dhh-Cre	5'GATGAGGTTCGCAAGAACCTGATG3'	5'AACAGCATTGCTGTCACTTGGTCG3'

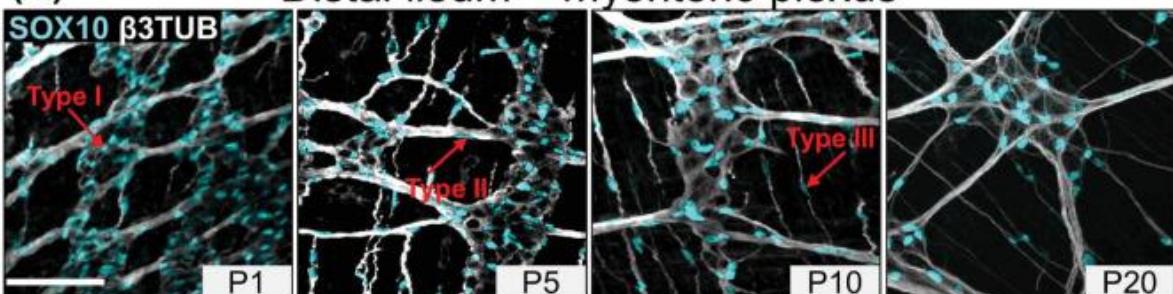
Table 2.S1 : Oligonucleotide primers used for genotyping.

ANTIBODY	SOURCE	HOST SPECIES	DILUTION
SOX10	Pilon lab (made by Medimabs)	Rat	1:500
SOX10	R&D Systems, #AF2864	Goat	1:500
S100β	Novus Biologicals, #NBP1-41373SS	Rabbit	1:500
βIII-Tubulin	Abcam, #ab78078	Mouse	1:500
Green Fluorescent Protein (GFP)	Abcam, #ab290	Rabbit	1:500
Green Fluorescent Protein (GFP), N-terminal	Sigma-Aldrich, #G6795	Mouse	1:500
Myelin Protein Zero (MPZ)	Abcam, #ab31851	Rabbit	1:500
AlexaFluor 488 Anti-rat	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 712-545-151	Donkey	1:500
AlexaFluor 594 Anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 711-585-152	Donkey	1:500
AlexaFluor 647 Anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 715-605-150	Donkey	1:500
AlexaFluor 488 Anti-goat	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 805-545-180	Bovine	1:500

Table 2.S1 : Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence.

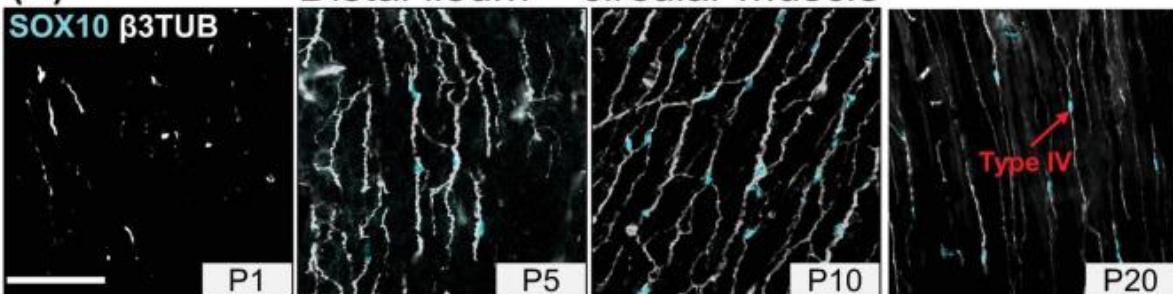
(A)

Distal ileum – myenteric plexus

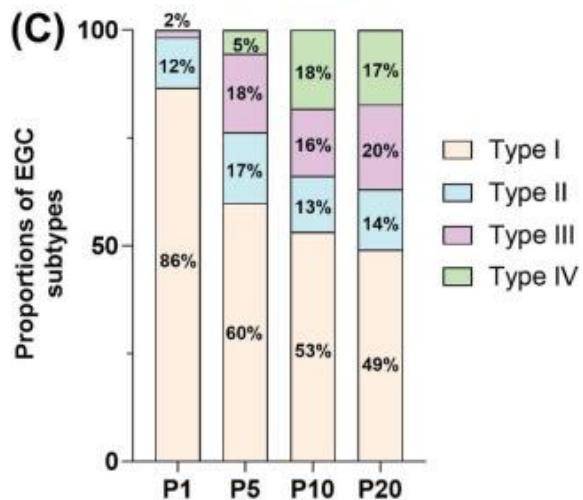


(B)

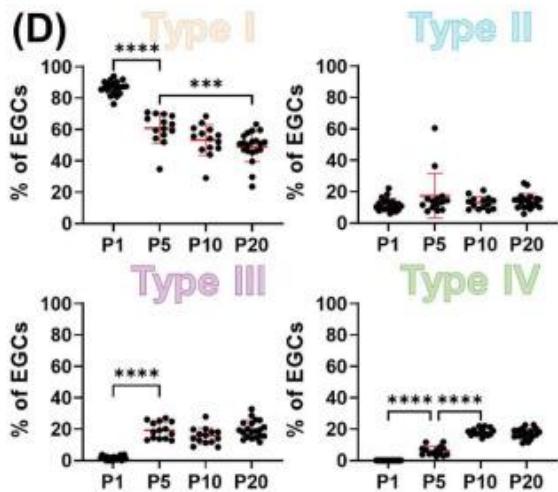
Distal ileum – circular muscle



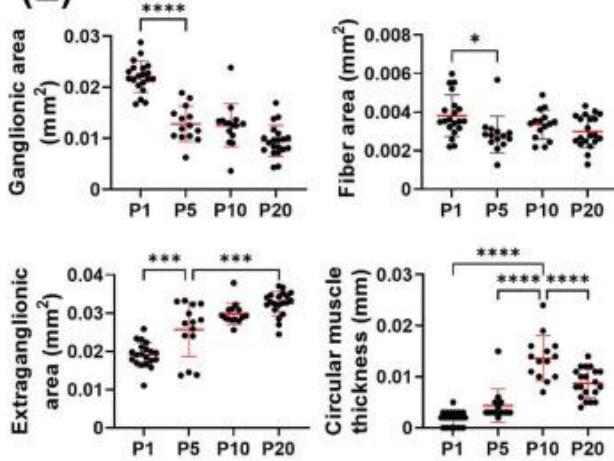
(C)



(D)



(E)



(F)

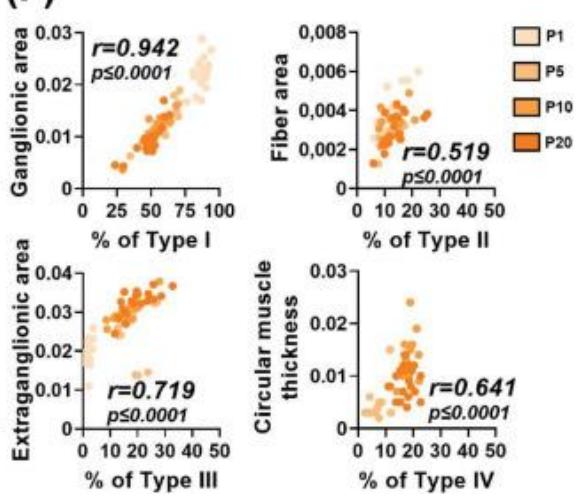
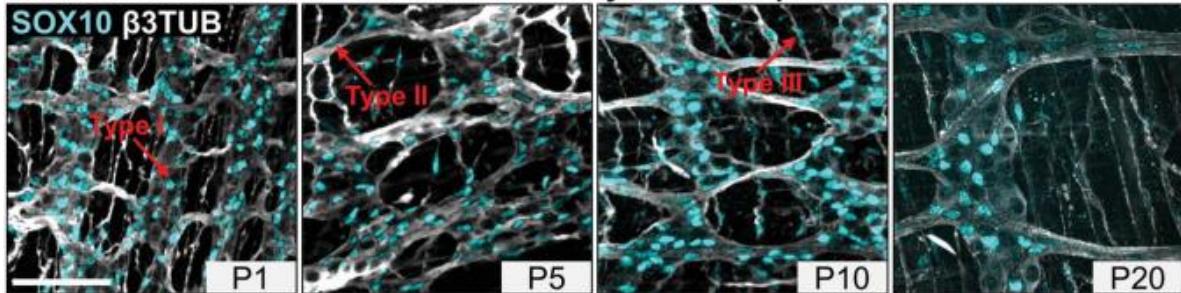


Figure 2.1 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal myenteric plexus of the distal ileum.

(A-B) Immunofluorescence analysis of the myenteric plexus (A) and associated circular muscle (B) in the distal ileum of wild-type FVB mice, at indicated postnatal ages (P1, P5, P10 and P20). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m. (C-D) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Type I to IV, using images such as those displayed in panels A-B (N=3 mice per time point; n=3 to 5 60x fields of view per animal). (E) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area, interganglionic fiber surface area and circular muscle thickness) in the distal ileum as a function of age during the early postnatal period. (F) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, Type III proportion and extraganglionic area, and Type IV and circular muscle thickness. Colored symbols correspond to the indicated time points. r is Pearson's correlation coefficient. ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001; One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

(A) Distal colon – myenteric plexus



(B) Distal colon – circular muscle

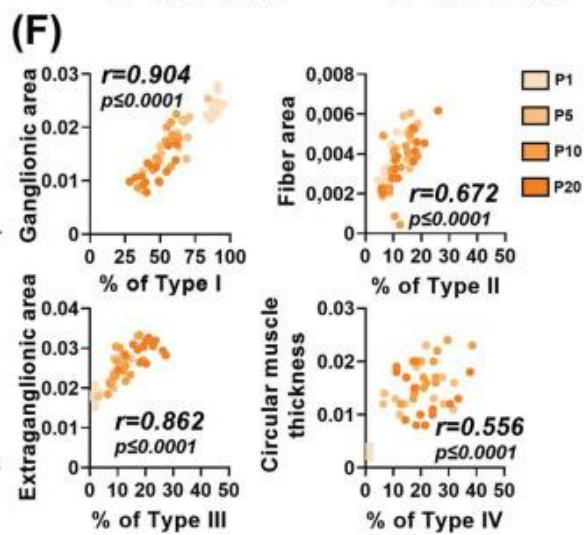
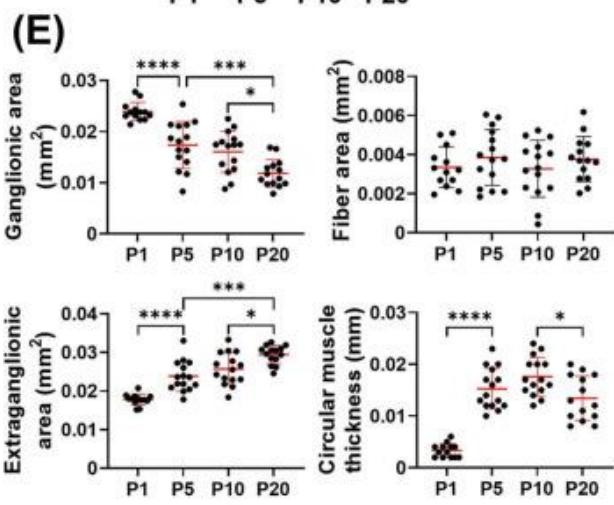
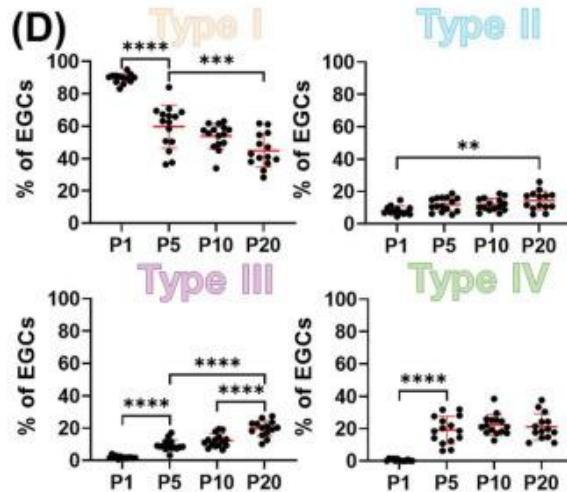
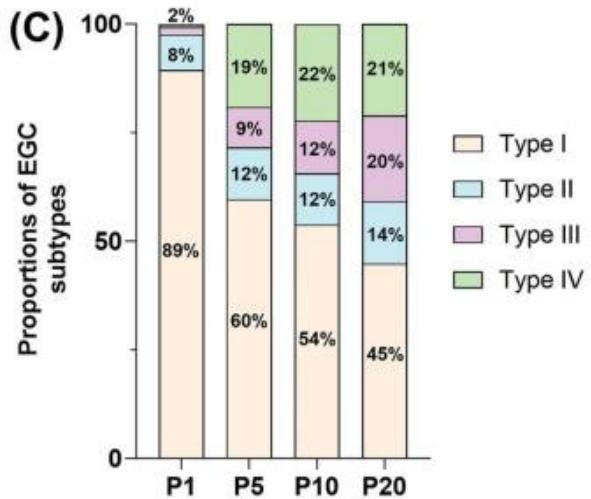
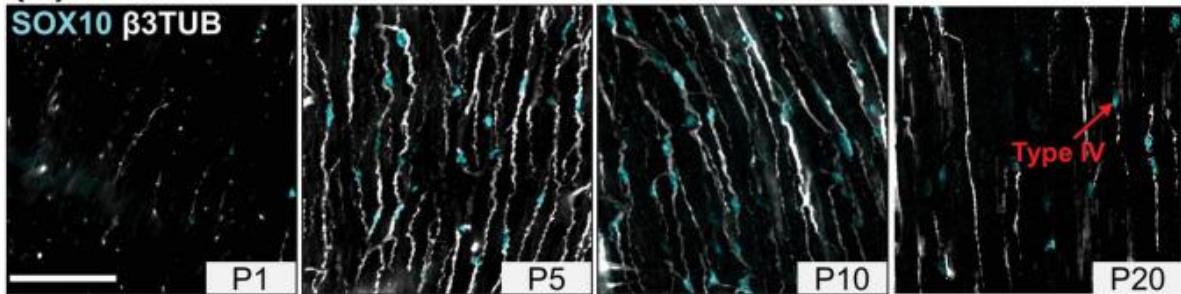


Figure 2.2 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal myenteric plexus of the distal colon.

(A-B) Immunofluorescence analysis of the myenteric plexus (A) and associated circular muscle (B) in the distal colon of wild-type FVB mice, at indicated postnatal ages (P1, P5, P10 and P20). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m. (C-D) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Type I to IV, using images such as those displayed in panels A-B (N=3 mice per time point; n=3 to 5 60x fields of view per animal). (E) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area, interganglionic fiber surface area and circular muscle thickness) in the distal colon as a function of age during the early postnatal period. (F) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, Type III proportion and extraganglionic area, and Type IV and circular muscle thickness. Colored symbols correspond to the indicated time points. r is Pearson's correlation coefficient. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$; One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

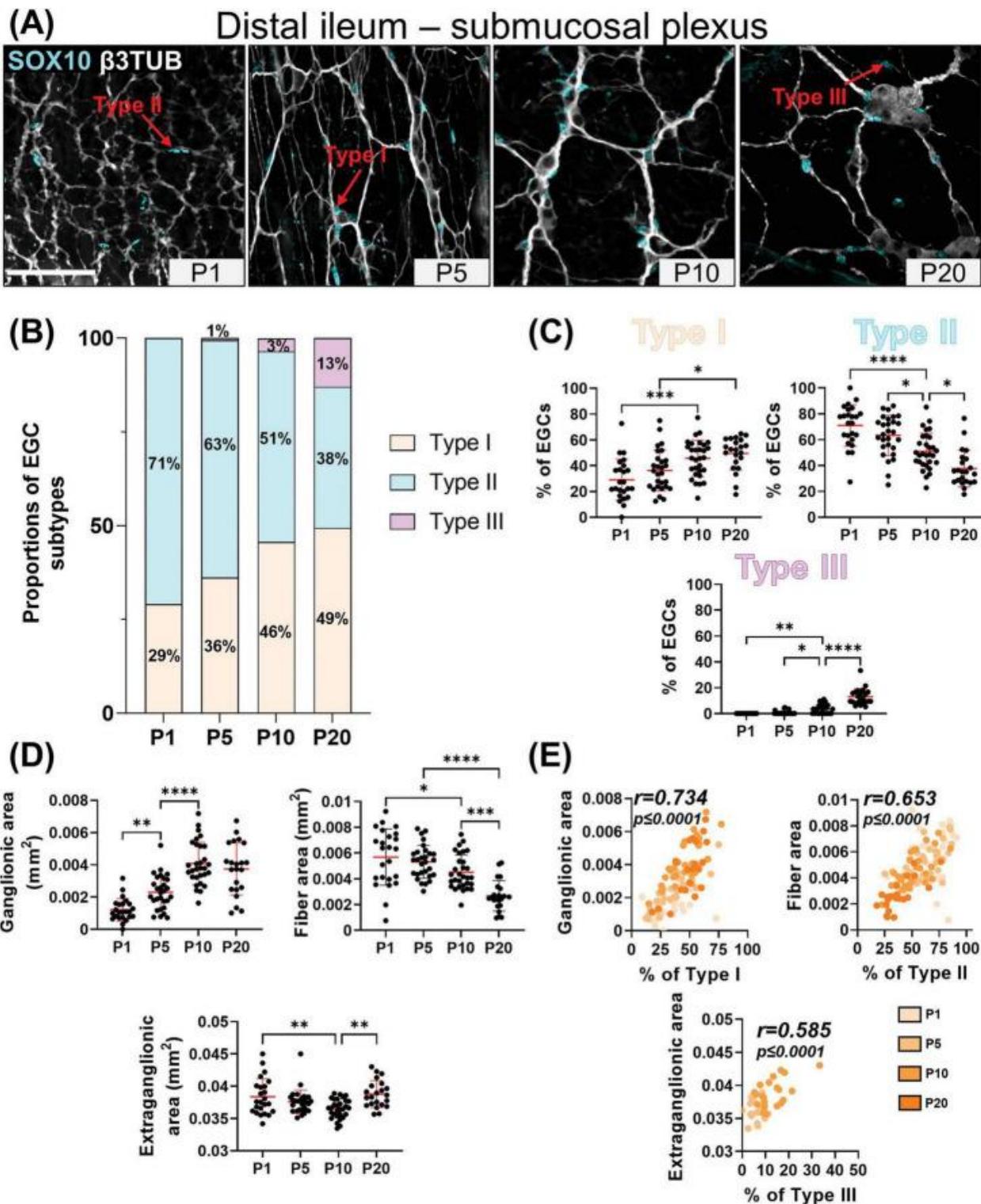


Figure 2.3 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal submucosal plexus of the distal ileum.

(A) Immunofluorescence analysis of the submucosal plexus in the distal ileum of wild-type FVB mice, at indicated postnatal ages (P1, P5, P10 and P20). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m. (B-C) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Type I to IV, using images such as those displayed in panel A (N=3 mice per time point; n=3 to 5 60x fields of view per animal). (D) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area, and interganglionic fiber surface area) in the distal ileum as a function of age during the early postnatal period. (E) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, and Type III proportion and extraganglionic area. Colored symbols correspond to the indicated time points. r is Pearson's correlation coefficient. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$; One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

(A)

Distal colon – submucosal plexus

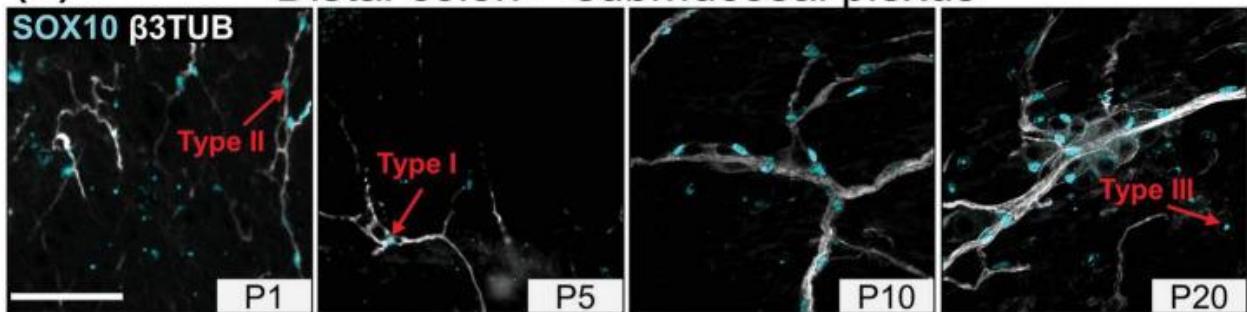
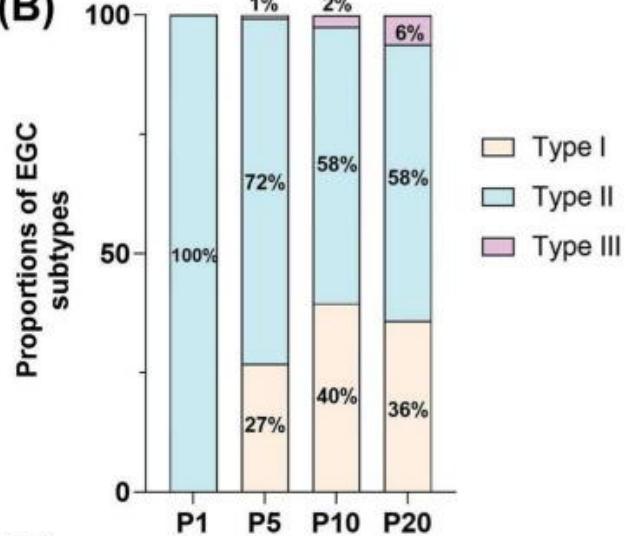
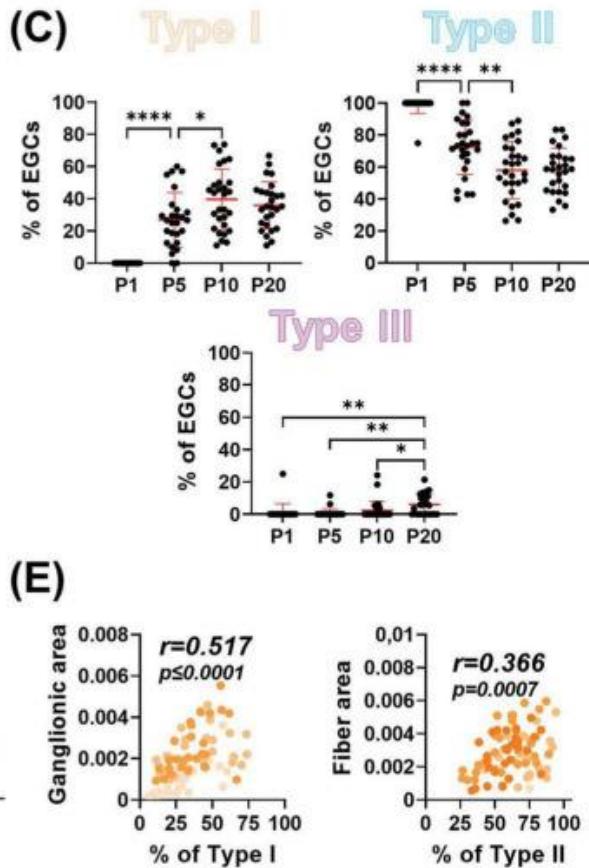
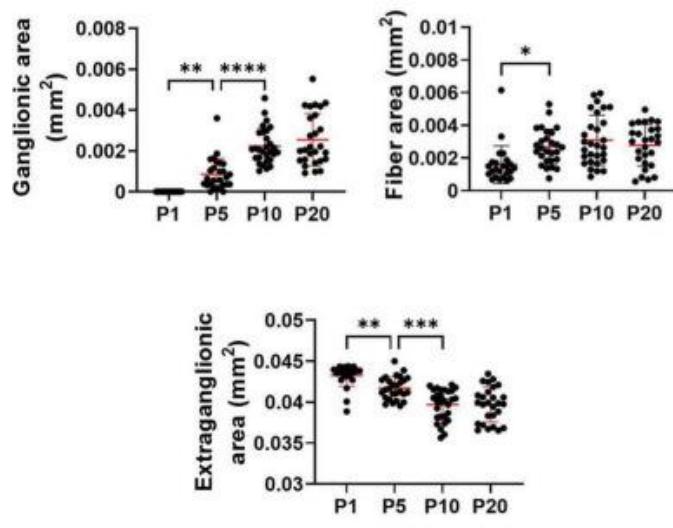
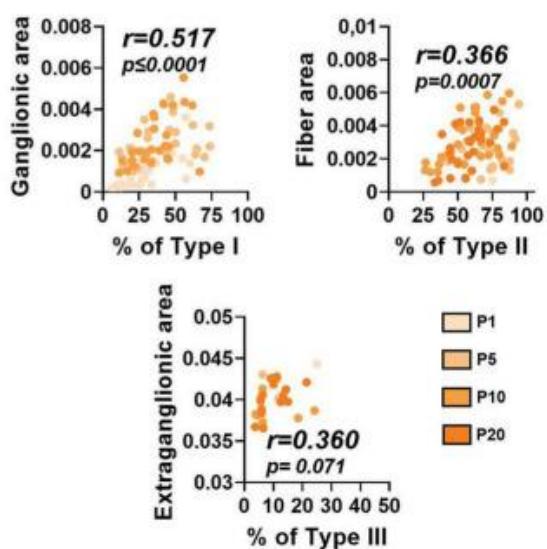
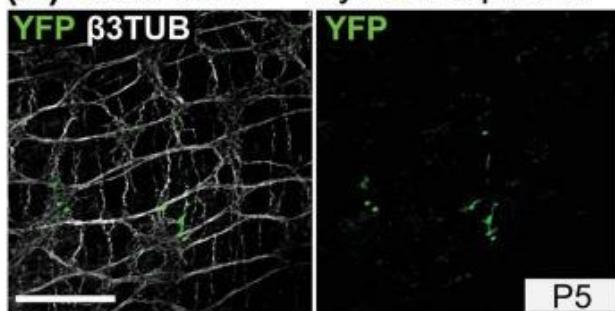
**(B)****(C)****(D)****(E)**

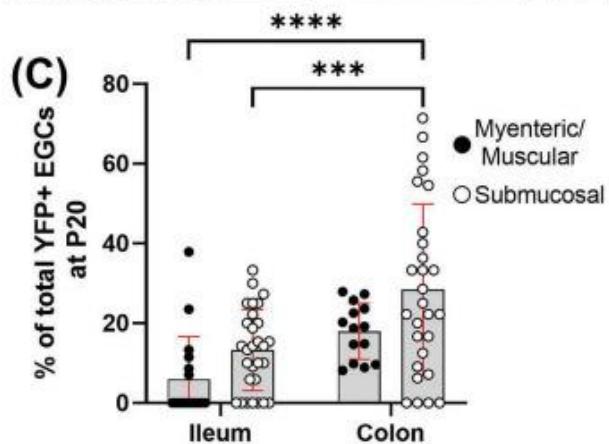
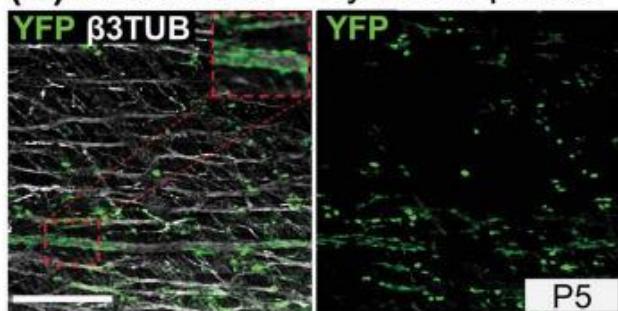
Figure 2.4 : Analysis of EGC diversity in the maturing postnatal submucosal plexus of the distal colon.

(A) Immunofluorescence analysis of the submucosal plexus in the distal colon of FVB WT mice, at indicated postnatal ages (P1, P5, P10 and P20). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m. (B-C) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Type I to IV, using images such as those displayed in panel A (N=3 mice per time point; n=3 to 5 60x fields of view per animal). (D) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area, and interganglionic fiber surface area) in the distal colon as a function of age during the early postnatal period. (E) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, and Type III proportion and extraganglionic area. Colored symbols correspond to the indicated time points. r is Pearson's correlation coefficient. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$; One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

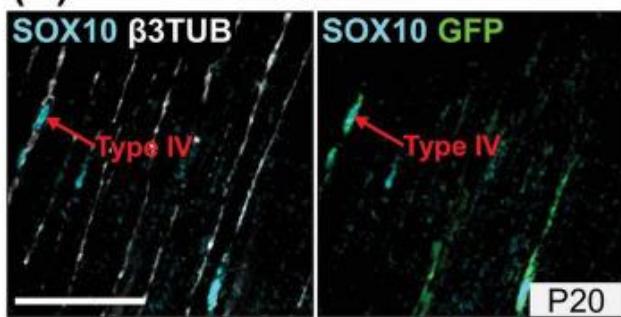
(A) Distal ileum – Myenteric plexus



(B) Distal colon – Myenteric plexus

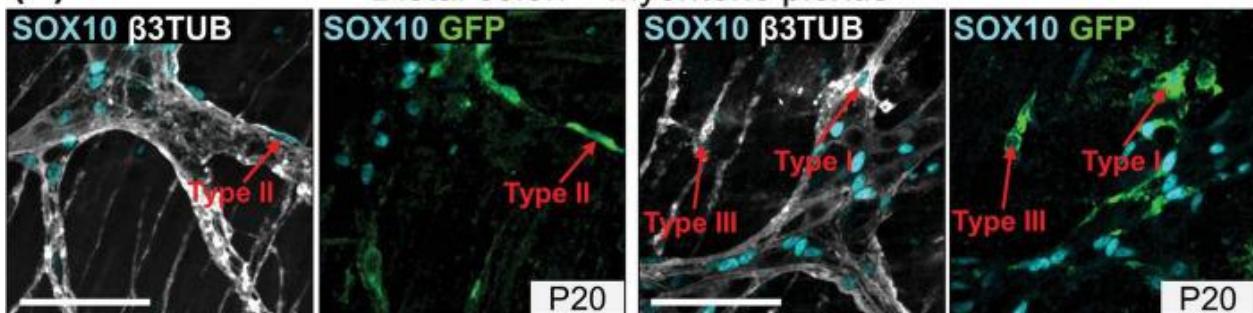


(D) Distal colon – Circular muscle



(E)

Distal colon – Myenteric plexus



(F)

Distal colon – Submucosal plexus

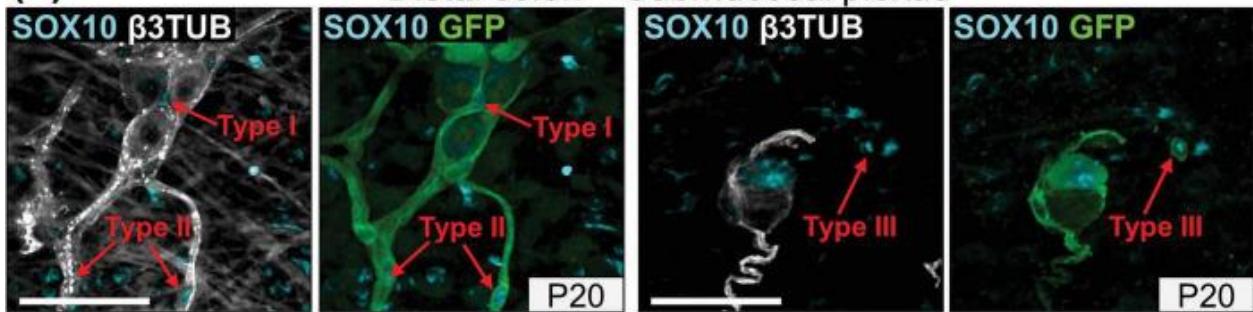
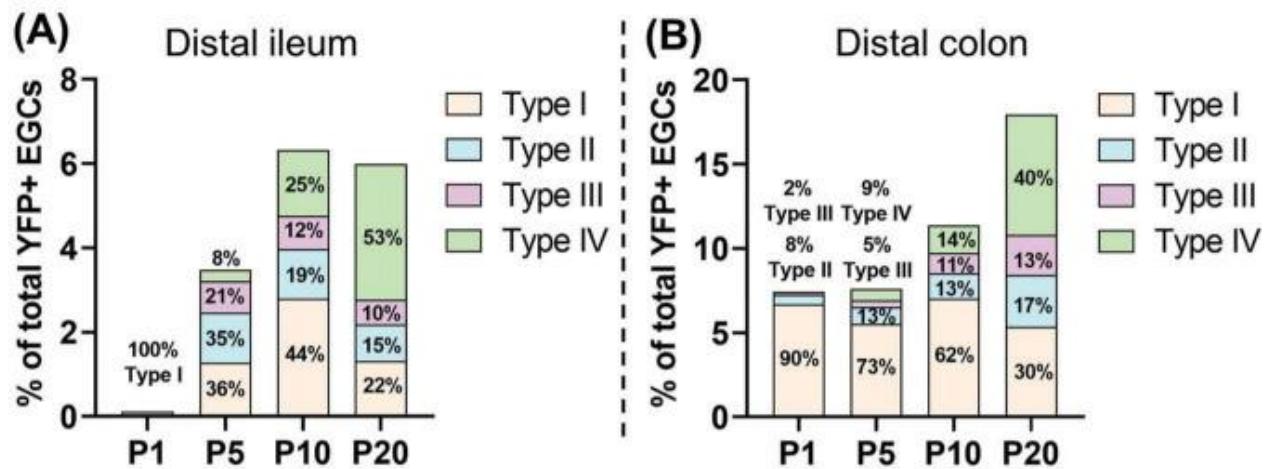


Figure 2.5 : Global analysis of the SCP contribution to enteric gliogenesis.

(A-B) Immunofluorescence-based analysis of the distribution of YFP+ SCPs in the myenteric plexus of the distal ileum (A) and distal colon (B) from *Dhh-Cre;Rosa26^{FlaxedSTOP/YFP}* mice at P5. Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against GFP/YFP for SCP-derived cells (green) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 200 μ m. (C) Quantitative analysis of the global SCP contribution to enteric gliogenesis in the myenteric plexus/muscular layer (black dots) and submucosal plexus (white dots) of the distal ileum and distal colon from *Dhh-Cre;Rosa26^{FlaxedSTOP/YFP}* mice at P20. Each dot represents the percentage of YFP+ SOX10+ EGCs over the total of SOX10+ EGCs in a single 60x field of view for N=3 mice (n=3-5 fields of view per tissue for the myenteric plexus/muscular layer; n= 6-10 fields of view per tissue for the submucosal layer). (D-F) Immunofluorescence analysis of the circular muscle layer (D), the myenteric plexus (E) and the submucosal plexus (F) of the distal colon from *Dhh-Cre;Rosa26^{FlaxedSTOP/YFP}* mice at P20. Tissues were immunolabeled with SOX10 (cyan), GFP/YFP (green) and β III-Tubulin antibodies (grey). Scale bar, 70 μ m. ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001; Two-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

Myenteric plexus



Submucosal plexus

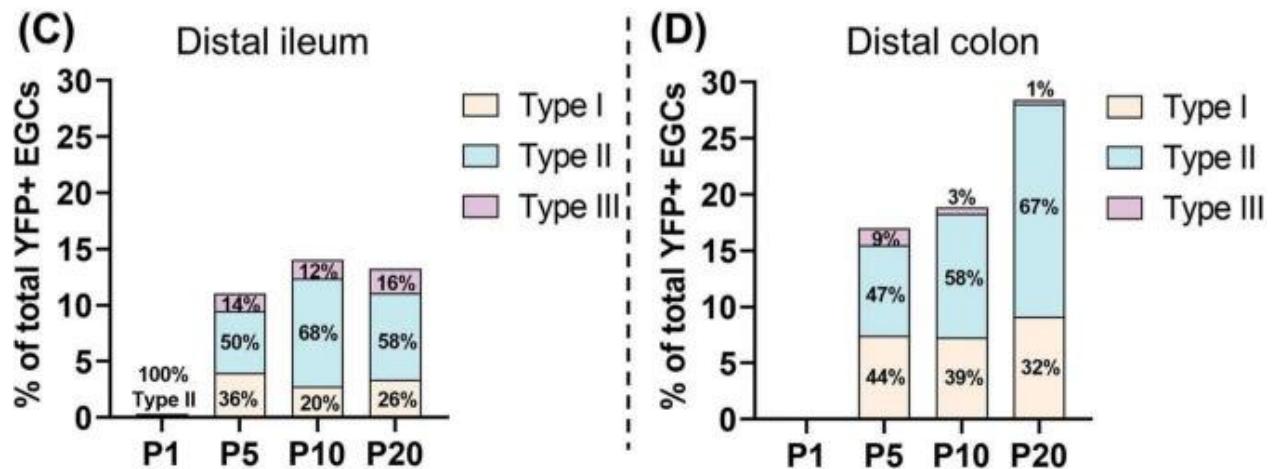


Figure 2.6 : Detailed analysis of the SCP contribution to EGC diversity.

(A-D) Quantitative analysis of the SCP contribution to enteric gliogenesis as a function of EGC Types I to IV, in the myenteric plexus/muscular layer of the distal ileum (A) and the distal colon (B), as well as in the submucosal plexus of the distal ileum (C) and the distal colon (D). EGC subtypes were quantified using images such as those displayed in Figure 5D-F (N=3 mice; n=3-5 fields of view per tissue for the myenteric plexus/muscular layer; n= 6-10 fields of view per tissue for the submucosal layer). Size of sub-bars corresponds to the average of the percentage of YFP+ SOX10+ EGCs among all SOX10+ EGCs, in the indicated tissue layers and bowel segments.

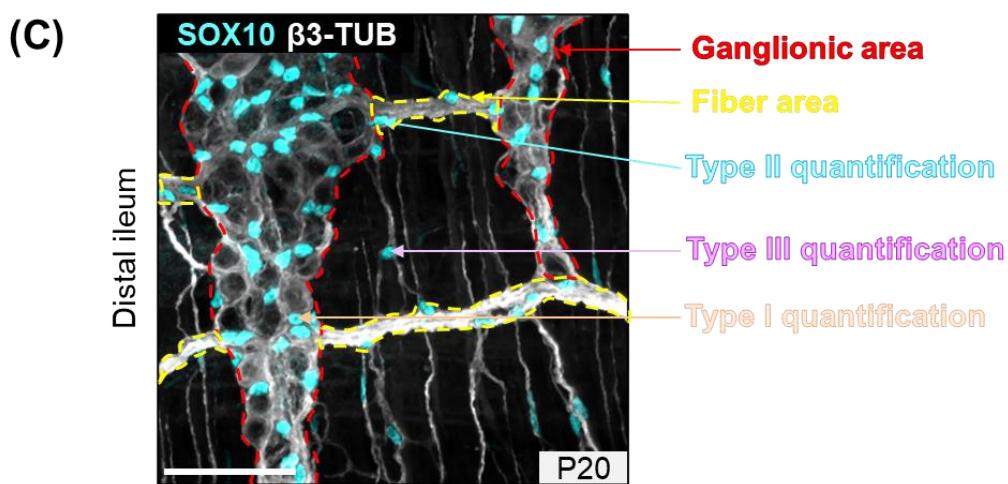
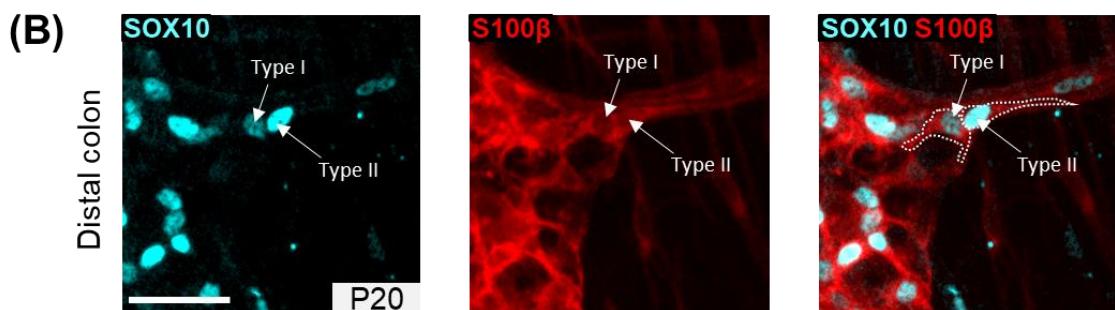
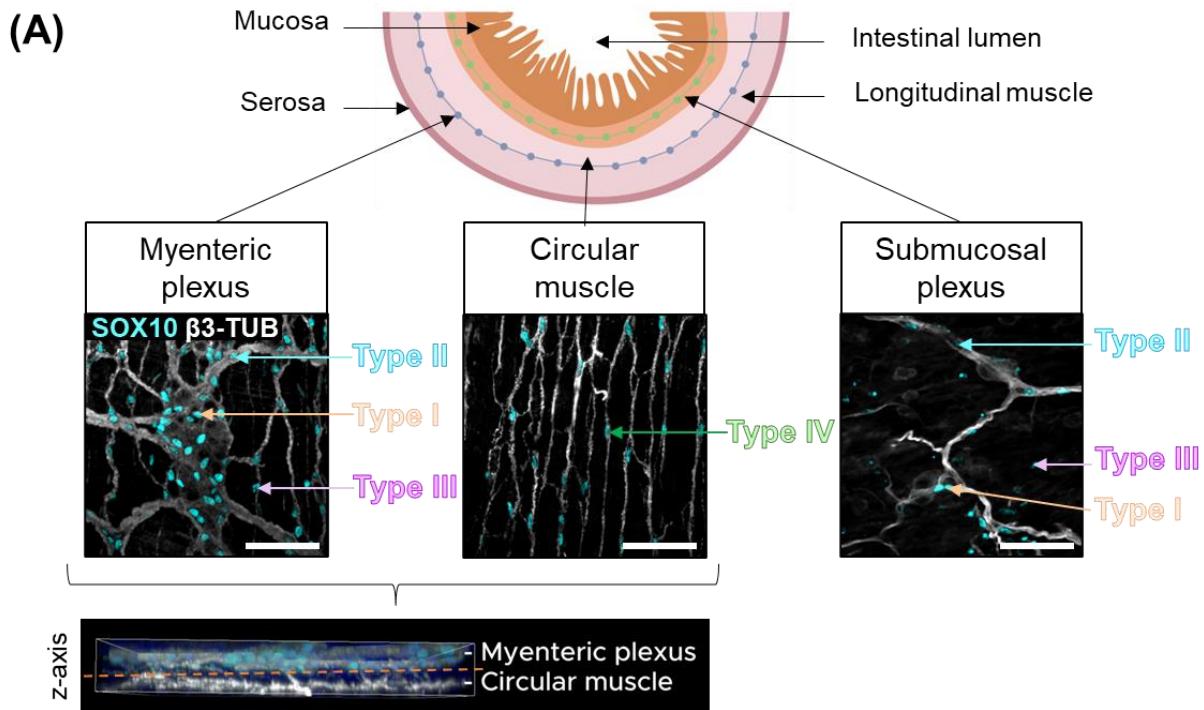
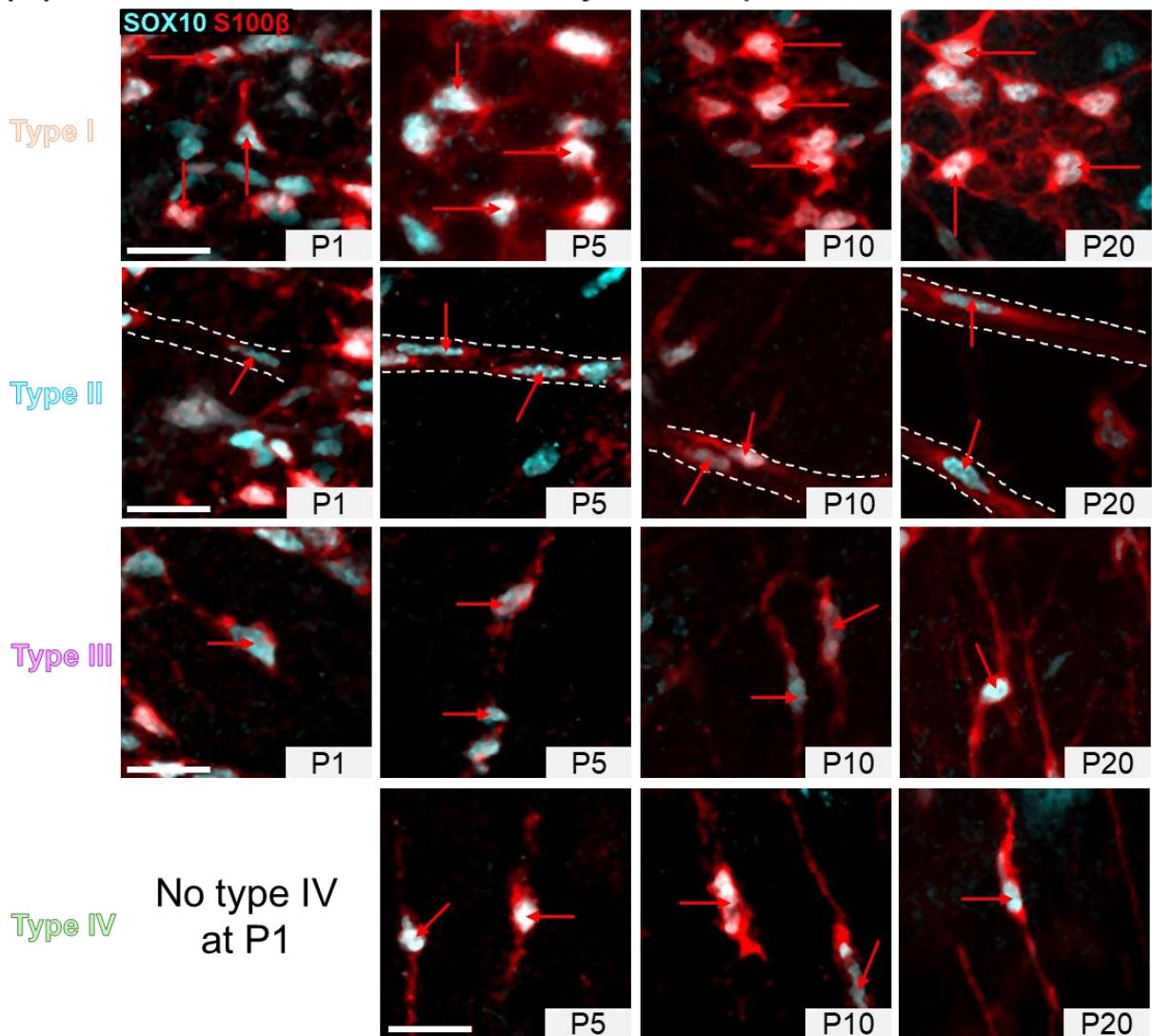


Figure S2.1 : Overview of experimental design and approaches for identifying topo-morphological subtypes of EGCs and quantifying structural changes in the ENS.

(A) Schematic of the classification system used to categorize EGC subtypes based on topological criteria. Type I are located in ganglia, Type II at the border of and within interganglionic fibers, Type III in the same plane of the plexuses but outside ganglia and fibers, and Type IV deep in the muscle layer. (B) Immunofluorescence staining of P20 distal colon showing how to discriminate between Type II EGCs at fiber edges from Type I EGCs, based on their respective morphology. Type I EGCs exhibit multiple processes extending in different directions whereas Type II exhibit fibrous processes that run in parallel to interganglionic fibers. Tissue was immunolabeled with antibodies against the nuclear EGC marker SOX10 and the cytoplasmic EGC marker S100 β , allowing to discern gross EGC morphology. (C) Immunofluorescence staining of P20 distal colon with SOX10 and β III-Tubulin antibodies, showing the methodology for quantification of EGC subtypes and morphometric parameters. Scale bar, 70 μ m (A, C) or 35 μ m (B).

(A)

Distal ileum - myenteric plexus



(B)

Distal ileum – submucosal plexus

Type I

Type II

Type III

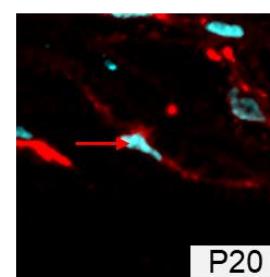
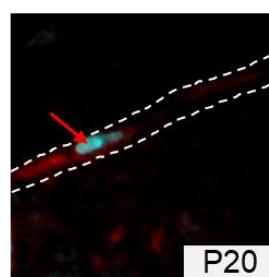
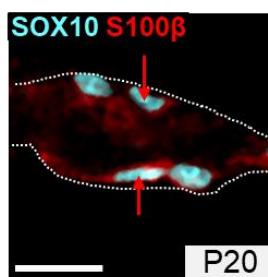


Figure S2.2 : Morphological evolution of EGC subtypes between P1 and P20.

(A-B) Representative images of SOX10+ S100 β + EGC subtypes showing that each subtype gradually acquires its main gross morphological attributes (multipolar Type I, elongated Type II, multipolar Type III, bipolar Type IV) before P20 in the myenteric plexus of the distal ileum (A), but not yet in the submucosal plexus of the same bowel segment (B). Scale bar, 20 μ m

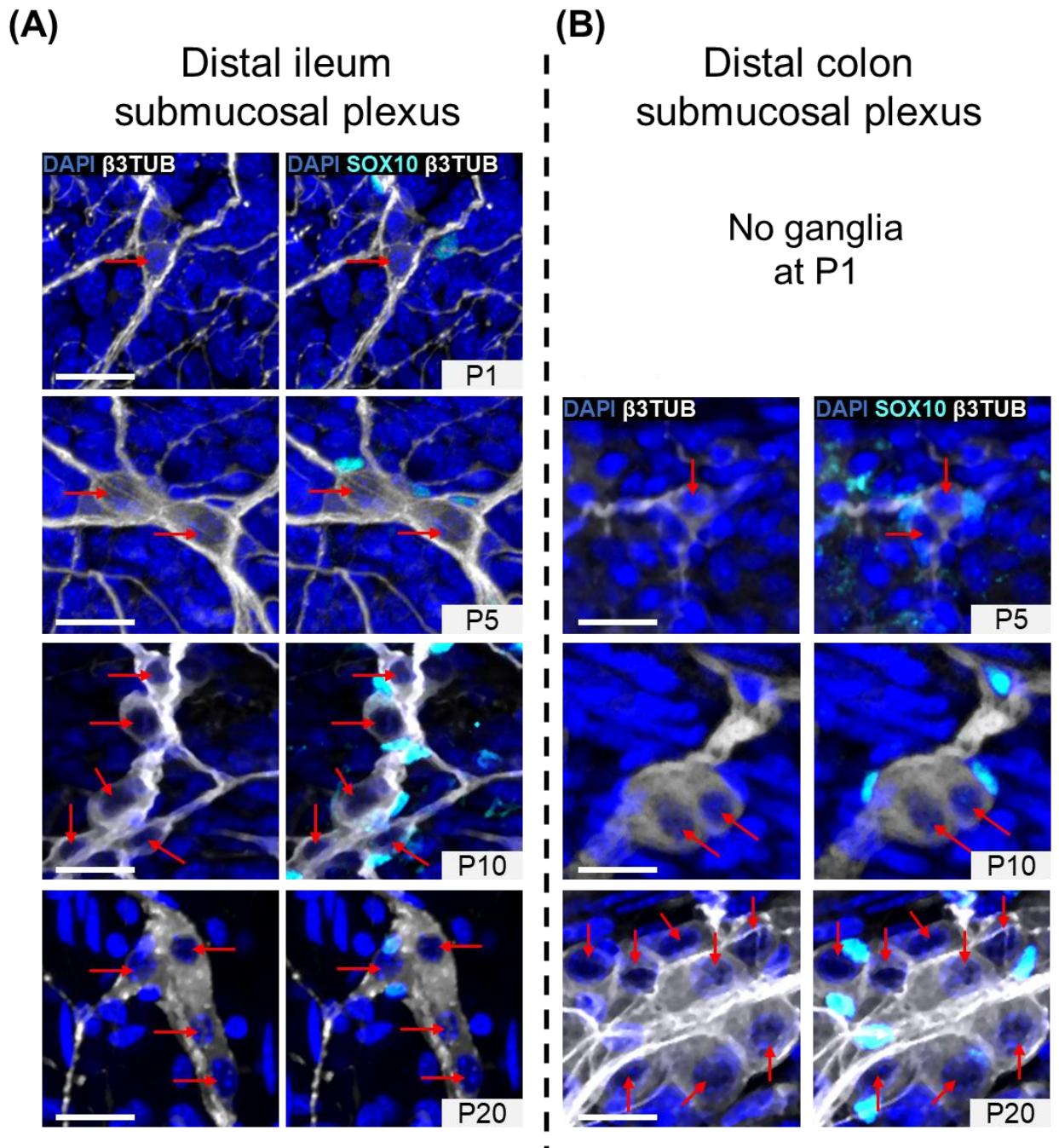
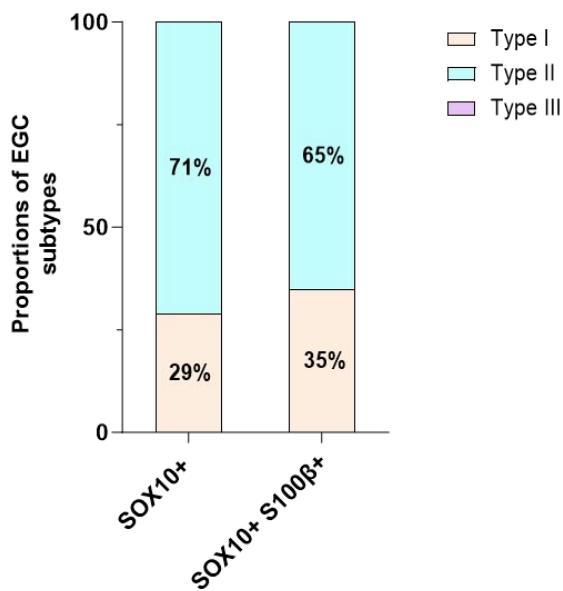
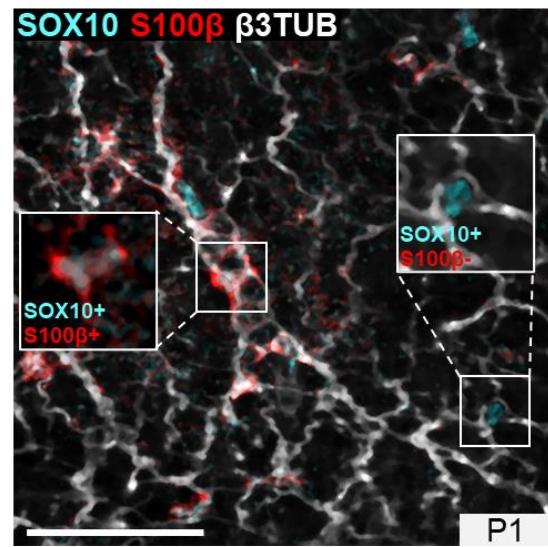


Figure S2.3 : The identification of submucosal ganglia is facilitated by DAPI staining of neuronal nuclei.
(A-B) Representative images of b3TUB⁺ neuronal networks showing that DAPI staining allows to distinguish the round nucleus of neurons (arrows) in submucosal ganglia of variable sizes (≥ 1 neuron) between P1 and P20, in both the distal ileum (A) and distal colon (B). Scale bar, 20 μm .

(A) Distal ileum
submucosal plexus



(B) Distal colon
submucosal plexus

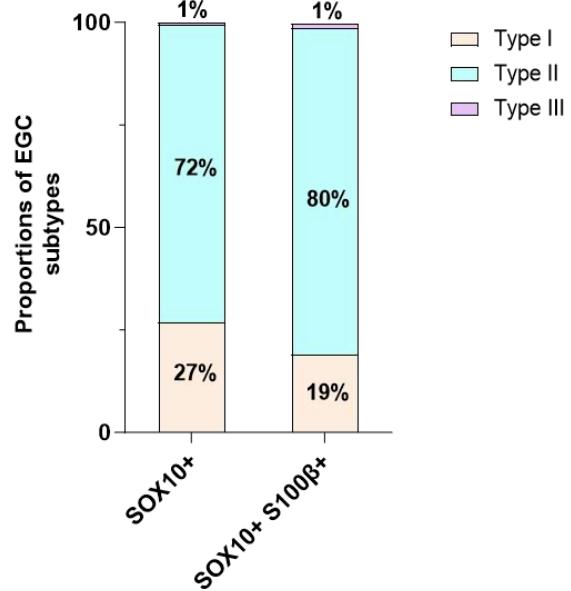
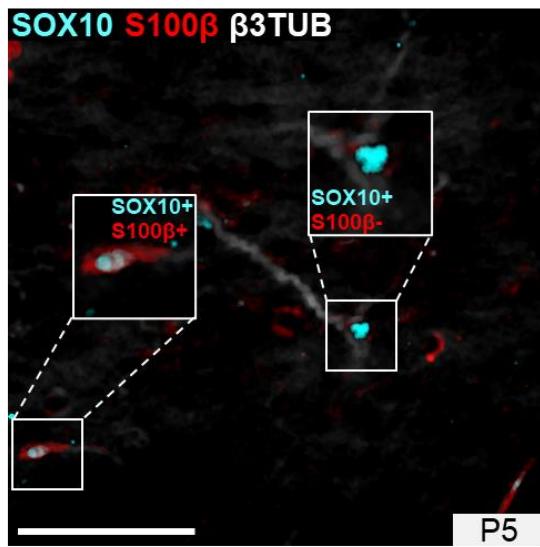
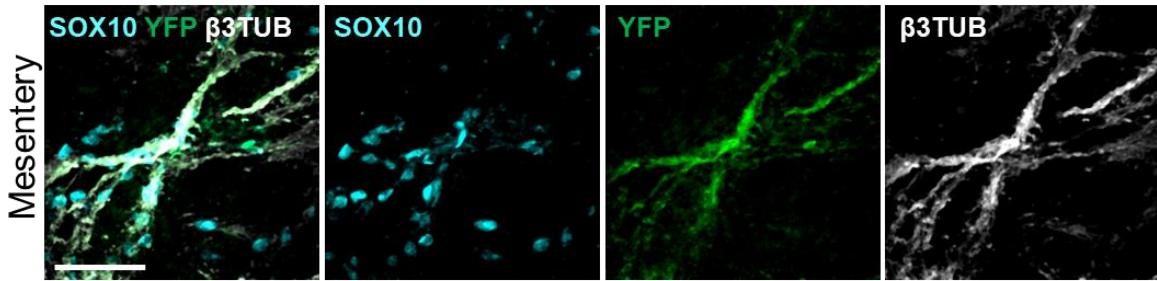


Figure S2.4 : Comparison of EGC subtype proportions in the submucosal plexus at early postnatal stages, using either SOX10 data alone or combined SOX10-S100 β data.

(A-B) Representative images of EGCs that stain positive for either SOX10 alone or for both SOX10 and S100 β (insets in upper panels), and accompanying quantifications (lower panels) of EGC Type I, Type II and Type III in the submucosal plexus of the distal ileum at P1 (A) and distal colon at P5 (B). Scale bar, 70 μ m.

(A)

E14.5 gut



(B)

E14.5 gut

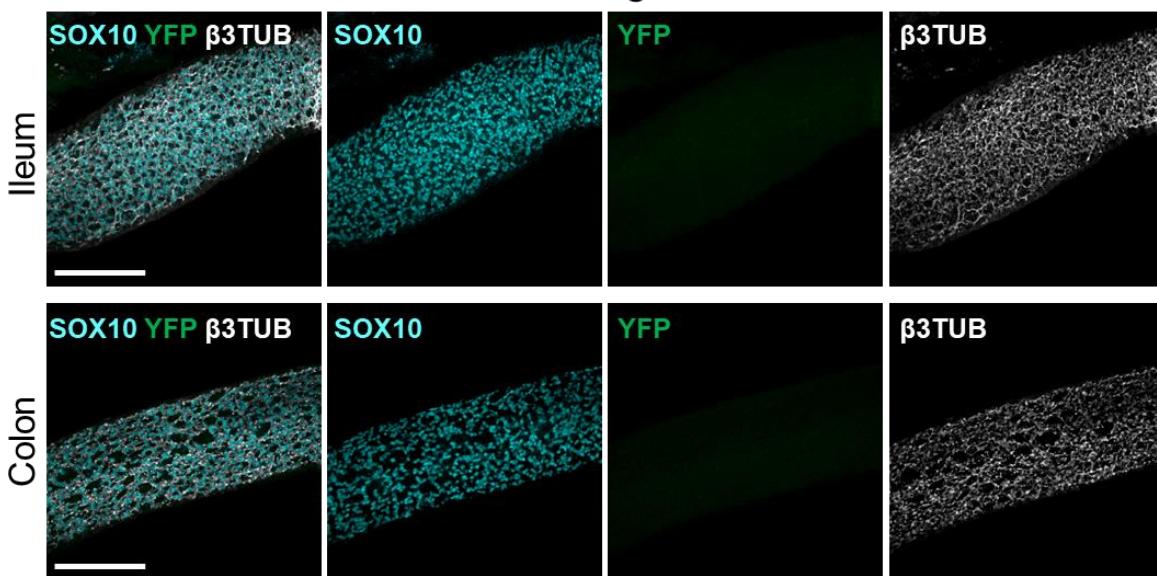
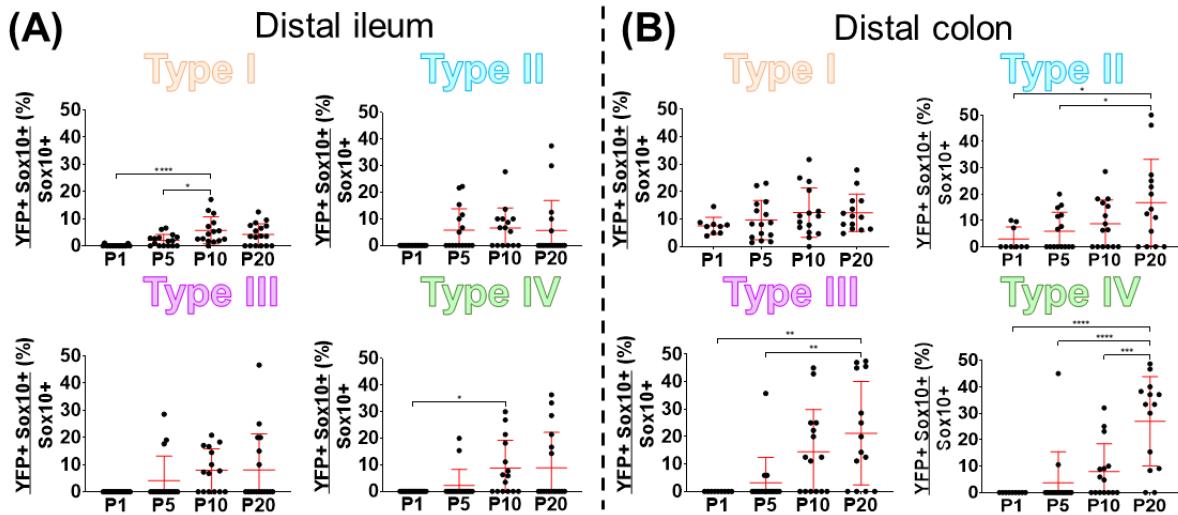


Figure S2.5 : The *Dhh-Cre;Rosa26[FlxedSTOP]YFP* system specifically labels extrinsic SCPs and none of the intrinsic ENS progenitors directly derived from neural crest cells.

(A-B) Representative images of e14.5 embryonic guts showing that YFP is detected in a subset of SOX10+ cells along extrinsic b3TUB+ mesentery-associated nerves (A) but not in any of the intrinsic tissue-resident SOX10+ ENS progenitors in the distal ileum and distal colon (B). Scale bar, 70 μ m (A) or 200 μ m (B).

Myenteric plexus



Submucosal plexus

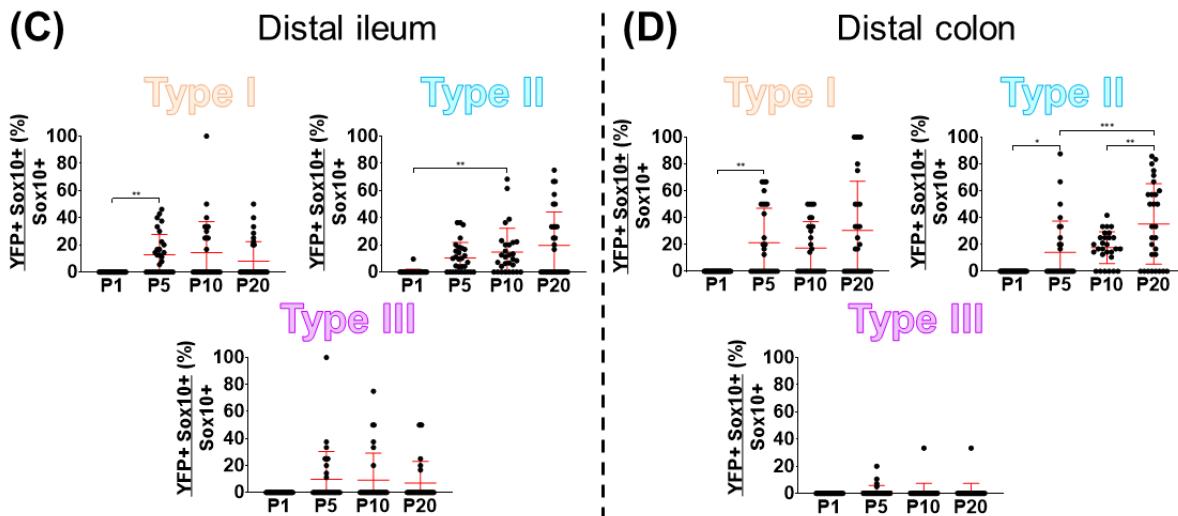
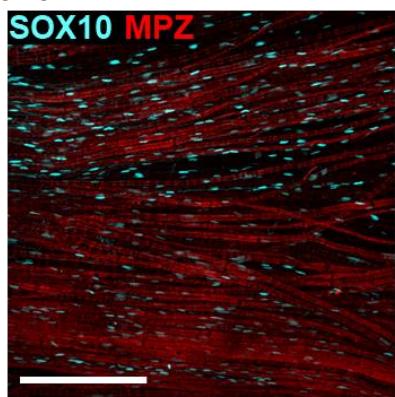


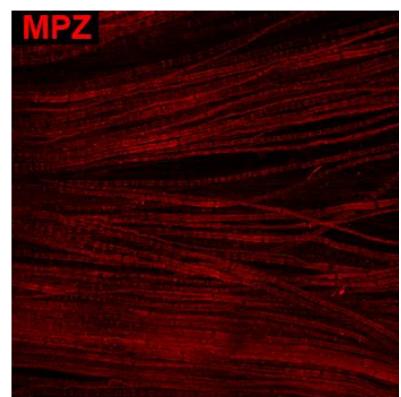
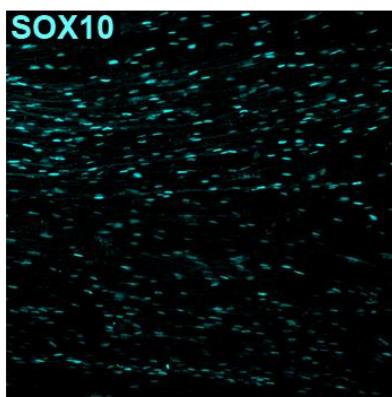
Figure S2.6 : Contribution of SCPs to topo-morphological EGC subtypes, detailed per sample.

(A-D) Quantitative analysis of YFP+ SOX10+ EGCs proportion among total SOX10+ EGC Type I, II, III or IV, between P1 and P20, in the myenteric plexus of the distal ileum (A) and of the distal colon (B), as well as in the submucosal plexus of the distal ileum (C) and of the distal colon (D). Each dot represents the percentage of YFP+ SOX10+ EGC Type I, II, III or IV in a single 60X field of view (N=3 mice per time point, n=3-5 fields of view per tissue for the myenteric plexus/muscular layer; n= 6-10 fields of view per tissue for the submucosal layer). * $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$, *** $P\leq 0.001$, **** $P\leq 0.0001$; One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test.

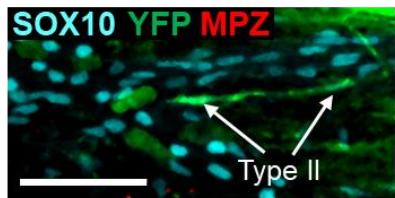
(A)



Adult sciatic nerve



(B)



P15 distal colon

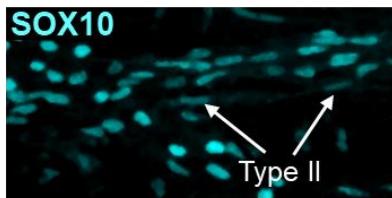


Figure S2.7 : MPZ is not detected in SCP-derived EGCs from the distal colon of P15 mice.

(A-B) Immunofluorescence analysis of the adult sciatic nerve from WT FVB mice (A) and myenteric plexus from the distal colon of P15 *Dhh-Cre;Rosa26^{FlaxedSTOPYFP}* mice (B). Tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 (cyan), MPZ (red) and/or GFP/YFP (green). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice. Scale bar, 200 μm (A) or 50 μm (B).

CHAPITRE 3

IN VIVO EVIDENCE OF A HIERARCHICAL MODE OF ENTERIC GLIAL CELL DIVERSIFICATION AND INTRINSIC DEVELOPMENTAL PLASTICITY WITHIN THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM

Marie A. Lefèvre ^{1,2}, Mylène Bourgeois ^{1,2}, Rodolphe Soret ^{1,2,*}, Nicolas Pilon ^{1,2,3,*}.

¹Molecular Genetics of Development Laboratory, Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal, QC, Canada

²Centre D'excellence en Recherche sur les Maladies Orphelines-Fondation Courtois (CERMO-FC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC, Canada

³Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

✉*Correspondence: Rodolphe Soret, soret.rodolphe@uqam.ca

*Nicolas Pilon, pilon.nicolas@uqam.ca

Contributions

Marie Lefèvre : Collecte et curation des données, Analyse formelle, Investigations, Visualisation, Rédaction – brouillon initial. Mylène Bourgeois : Investigations (Figure 1 et 2), Validation, Rédaction – brouillon initial. Rodolphe Soret : Analyse formelle, Supervision, Visualisation, Rédaction – brouillon initial. Nicolas Pilon : Obtention des financements, Supervision, Rédaction – brouillon initial, Rédaction – relecture et révision.

Manuscrit soumis à *Frontiers in Neurosciences* le 8 septembre 2025.

3.1 Résumé

Les cellules gliales entériques (CGE) représentent une population hautement hétérogène, localisée à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des réseaux ganglionnaires du système nerveux entérique (SNE). Malgré la disponibilité de plusieurs jeux de données transcriptomiques de séquençage par cellule unique pertinents, la classification des CGE en divers sous-types repose encore principalement sur leur localisation particulière et leurs attributs morphologiques associés. Nous avons récemment rapporté que la génération de ces sous-types « topo-morphologiques » de CGE chez des souris saines est influencée par les changements structuraux qui surviennent dans l'intestin au début de la période postnatale. Ce processus est également influencé par la source des progéniteurs du SNE, avec une contribution notablement biaisée des PCS. Ce travail antérieur suggérait par ailleurs l'existence d'un programme hiérarchique de différenciation spatio-temporelle, dans lequel les CGE intra-réseau du plexus myentérique donnent séquentiellement naissance à des CGE extra-réseau proches localement ainsi qu'à des CGE intra- et extra-réseau plus distants du plexus sous-muqueux. Afin d'en apprendre davantage sur la diversification des CGE, nous avons considéré que le modèle murin *Nr2f1^{Spt/Spt}* du syndrome de Waardenburg de type IV pourrait être particulièrement informatif, l'absence de SNE dans le côlon de ces souris étant due à une différenciation gliale prématurée des progéniteurs du SNE avant la naissance. Nos nouvelles analyses postnatales de l'iléon, qui présente un SNE chez ces souris, ont révélé une acquisition anormale de la diversité des CGE. Ces altérations de la diversification des CGE s'accordent parfaitement avec le modèle hiérarchique de différenciation précédemment proposé. Ce travail a également mis en évidence un phénotype neuronal intrigant chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*, dans lequel une réduction du nombre de neurones est compensée par une augmentation de leur taille. Nombre de ces plus larges neurones présentent une identité mixte neuronale-gliale, ce qui, combiné à la contribution accrue des PCS au pool global de CGE, met encore davantage en lumière la remarquable plasticité du SNE en développement.

Mots clefs : Compensation adaptative, Plasticité développementale, Cellules gliales entériques, Système nerveux entérique, Neurones entériques, Traçage génétique de lignée cellulaire, Maladie de Hirschsprung, Précurseurs de cellules de Schwann, Syndrome de Waardenburg de type IV.

3.2 Abstract

Enteric glial cells (EGCs) represent a highly heterogeneous cell population residing both within and outside of the enteric nervous system (ENS) ganglionic networks. Despite the availability of several relevant single-cell transcriptomic datasets, the classification of EGCs in various subtypes is still mainly based on their particular location and associated morphological attributes. We recently reported that the generation of these “topo-morphological” EGC subtypes in healthy mice is influenced by the structural changes that occur in the early postnatal bowel. This process is also influenced by the source of ENS progenitors, with notable biased contributions by Schwann cell precursors (SCPs). This prior work further suggested the existence of a hierarchical program of spatiotemporal differentiation, whereby intra-network EGCs of the myenteric plexus sequentially give rise to nearby extra-network EGCs as well as to more distant intra- and extra-network EGCs of the submucosal plexus. To learn more about EGC diversification, we reasoned that the *Nr2f1^{Spt/Spt}* mouse model of Waardenburg syndrome type IV could be especially informative, as the absence of ENS in the colon of these mice is due to premature glial differentiation of ENS progenitors before birth. Our new postnatal analyses of the ENS-containing ileum from these mice revealed abnormal acquisition of EGC diversity. These alterations of EGC diversification are in perfect agreement with the previously proposed hierarchical differentiation model. This work also uncovered an intriguing neuronal phenotype in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice in which a reduction in the number of neurons is compensated for by an increase in their size. Many of these larger neurons have a mixed neuronal-glial identity, which together with the noted increased contribution of SCPs to the overall pool of EGCs further highlight the remarkable plasticity of the developing ENS.

Keywords: Adaptative compensation, Developmental plasticity, Enteric glial cells, Enteric nervous system, Enteric neurons, Genetic cell lineage tracing, Hirschsprung disease, Schwann cell precursors, Waardenburg syndrome type IV.

3.3 Introduction

The enteric nervous system (ENS) is a specialized division of the peripheral nervous system that orchestrates several gastrointestinal functions. It is mainly organized into two interconnected networks of ganglia, the myenteric and submucosal plexuses, which both contain enteric glial cells (EGCs) and neurons (Furness, 2012; Sharkey et Mawe, 2023). Unlike enteric neurons, many EGCs can in addition be found outside of these networks. While the diversity of enteric neuron subtypes is getting well characterized (Benthal *et al.*, 2024 ; Drokhlyansky *et al.*, 2020; May-Zhang *et al.*, 2021; Morarach *et al.*, 2021; Zeisel *et al.*, 2018), this is less the case for EGCs (Baghdadi *et al.*, 2022; Drokhlyansky *et al.*, 2020; Guyer *et al.*, 2023; Scavuzzo *et al.*, 2023 ; Schneider, K. M. *et al.*, 2023; Windster *et al.*, 2025; Wright *et al.*, 2021; Zeisel *et al.*, 2018). Yet, the crucial active roles played by EGCs in the regulation of gastrointestinal function in health and disease are now well recognized (Gonzales et Gulbransen, 2025; Lefevre *et al.*, 2023; Seguella et Gulbransen, 2021), underscoring the need to better understand their diversity. Single-cell sequencing techniques have identified up to nine EGC subpopulations (Baghdadi *et al.*, 2022; Drokhlyansky *et al.*, 2020; Guyer *et al.*, 2023; Scavuzzo *et al.*, 2023 ; Schneider, K. M. *et al.*, 2023; Wright *et al.*, 2021; Zeisel *et al.*, 2018) but no consensus has yet emerged. Hence, the most reliable classification system of EGC subpopulations still relies on closely associated topological and morphological characteristics that were first described more than 30 years ago (Hanani et Reichenbach, 1994). Four main subtypes are currently distinguished based on such topo-morphological criteria: highly branched Type I located in enteric ganglia, fibrous Type II cells in inter-ganglionic fibers, unbranched multipolar Type III cells outside these structures, and bipolar Type IV cells embedded in the circular and longitudinal muscle layers (Boesmans *et al.*, 2015; Charrier et Pilon, 2017; Gulbransen et Sharkey, 2012; Hanani et Reichenbach, 1994; Lefèvre *et al.*, 2024; McCallum *et al.*, 2020).

In a recent study seeking to understand how these topo-morphological subtypes are generated in wild-type (WT) FVB mice, we discovered that EGCs gradually diversify during the first three weeks after birth, when the ENS must adapt to significant structural changes in the maturing bowel wall (Lefèvre *et al.*, 2024). Our detailed temporal analyses of both myenteric and submucosal plexuses in two spatially distant segments of the gastrointestinal tract (more structurally mature distal ileum *vs.* less mature distal colon) led us to propose a hierarchical model of topo-morphological diversification – which also considered prior reports indicating that the submucosal plexus initially forms via inward cell migration from the myenteric plexus (Kapur *et al.*, 1992; Pham *et al.*, 1991). The proposed model stipulated that co-occurring Type I and II EGCs from the myenteric plexus sequentially give rise to nearby Types III and IV, as well as to EGCs in the submucosal

plexus, starting with Type II EGCs which then also likely contribute to sequentially generate submucosal Types I and III. This prior work further revealed that the source of ENS progenitors may influence EGC diversity as well, as EGCs can arise either from neural crest cells (NCCs) that directly colonize the developing gut or through an intermediary state of NCC-derived Schwann cell precursors (SCPs) that use extrinsic nerves as colonizing routes (Pilon, 2021; Uesaka *et al.*, 2015). At the end of post-natal maturation at P20, we found that SCPs contribute to all topo-morphological subtypes, but not equally, preferentially contributing to Type IV EGCs in the myenteric plexus/circular muscle and to Type II EGCs in the submucosal plexus (Lefèvre *et al.*, 2024).

Mouse models of developmental enteric neuropathies like Hirschsprung disease (aganglionic megacolon) can provide valuable insights into the basic mechanisms of ENS formation, including cell fate decisions. Notably, by focusing on the ENS-containing regions upstream of the aganglionic zone after birth, several groups have previously reported a common increased proportion of nitroergic neurons in several genetically distinct mutant mouse lines (Avila *et al.*, 2025; Bhave *et al.*, 2021; Bhave *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2016; Musser *et al.*, 2015; Roberts *et al.*, 2008; Touré *et al.*, 2019; Zaitoun *et al.*, 2013). Interestingly, the SCP contribution to the overall pool of enteric neurons was also found to be specifically increased in the hypoganglionic transition zone preceding aganglionosis, mostly giving rise to the nitroergic subtype as well (Uesaka *et al.*, 2021). However, only one study considered EGCs in such analysis, reporting no significant differences in the overall proportions of EGCs within the small intestinal and mid-colonic myenteric plexus of *Sox10*^{Dom/+} mice (Musser *et al.*, 2015). To the best of our knowledge, EGC diversification has never been investigated in this context. To begin addressing this question, we reasoned that mice homozygous for the *Spot* mutant allele of *Nr2f1* (*Nr2f1*^{Spt/Spt}) would be especially well-suited. These mice phenocopy Waardenburg syndrome type IV (WS4), combining aganglionic megacolon with SCP/melanocyte-related abnormalities in the skin and inner ear (Bergeron *et al.*, 2016; Bonnamour *et al.*, 2022). The *Spot* mutation leads to neural crest-specific upregulation of the transcription factor NR2F1, which was found to abnormally reinforce the glial fate. In the developing ENS, this translates into premature EGC differentiation of rostro-caudally migrating NCCs, which thereby fail to fully colonize the colon (Bergeron *et al.*, 2016). In SCPs, the overabundance of NR2F1 was found to rather prevent them from normally differentiating into melanoblasts (Bonnamour *et al.*, 2022), with as yet undetermined consequences for the ENS.

In this study, we evaluated both EGC diversification and the contribution of SCPs in the postnatal distal ileum of *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice. Our immunofluorescence and genetic cell lineage tracing data align closely with the previously proposed hierarchical differentiation model, while also providing further evidence of the great plasticity of the developing ENS.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Mice

Wild-type FVB mice [FVB/NCrl; Strain code 207] were purchased from Charles River Laboratory. *Spot* mice (*Nr2f1^{Sp1/+}*) were obtained through a pigmentation-based insertional mutagenesis screen aimed at identifying genes involved in neural crest cell development (Pilon, 2016) and bred to homozygosity to generate diseased individuals. SCP-derived cells were detected using a Cre/loxP lineage tracing system. The *Dhh*-Cre line [Jax stock #012929; FVB(Cg)-*Tg(Dhh-cre)1Mejr/J*], obtained from the Jackson Laboratory, was crossed with the *Rosa26*^{FloxedSTOPYFP} line [*Gt(ROSA)26Sor*^{TM1(EYFP)Cos}], kindly provided by Dr. Frank Costantini (Columbia University). All mouse lines were maintained on the FVB background and genotyped using either pigmentation pattern (for *Spot* mice) or standard PCR with primers listed in Supplementary Table 1. Breeding couples were housed in individually ventilated cages and fed the Charles River Rodent Diet #5075 (Cargill Animal Nutrition). All experiments were conducted in compliance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the institutional committee (CIPA #992 and #959) of the Université du Québec à Montréal (UQAM). Euthanasia was performed by decapitation for mice aged between postnatal day (P) 1 to P5; or by carbon dioxide (CO₂) exposure following isoflurane anesthesia for P15 mice. Animals of both sexes were included at each time point (see Supplementary Data Sheet 1).

3.4.2 Sample collection and processing

Euthanized mice were pinned to a Styrofoam slab, and the skin and peritoneum were opened to access the gastrointestinal tract. The most distal centimeter of the ileum, located just upstream of the cecum, was dissected out in ice-cold 1X PBS (Phosphate-Buffered Saline). Each sample was cut longitudinally along the mesentery, then washed in 1X PBS to remove fecal material, and pinned with the mucosal side facing up onto Sylgard-coated (Dow Corning, Freeland, MI) Petri dishes. The pinned tissues were fixed overnight in 4% paraformaldehyde diluted in 1X PBS and washed three times for 10-minutes in 1X PBS the next day. Additional microdissection was performed on tissues from P15 mice, to strip away the mucosal layer (containing the submucosal plexus) from the muscle layers (including the myenteric plexus).

3.4.3 Whole-mount immunofluorescence staining

Distal ileum samples were first permeabilized for 2 h in a blocking solution (5% Fetal Bovine Serum and 1% Triton-X100 in 1X PBS). They were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in the same blocking solution. Following three 10-min washes in 1X PBS, samples were incubated with relevant secondary antibodies, also diluted in blocking solution for 1 h 30. This step was followed by three

additional washes of 10 min in 1X PBS. During the second wash, samples were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) diluted in 1X PBS. The list of antibodies and their respective dilution factors are provided in Supplementary Table 2. Finally, stained tissues were mounted between two 24 x 50 mm glass coverslips in 100% Glycerol, for plexus visualization by confocal microscopy.

3.4.4 Imaging and data analysis

Immunofluorescence images were captured with a Nikon A1 confocal microscope equipped with Plan Fluor 20x/0.75 MImm and Plan Apo λ 60x/1.40 objectives. For each biological replicate, 3 to 10 representative z-stack images were acquired, and subsequently analyzed using the ImageJ software. As previously described (Lefèvre *et al.*, 2024), we manually quantified SOX10+ or S100β+ EGCS subtypes, using the “Cell Counter” plugin. We measured the surface area of ganglia, extraganglionic space, interganglionic fibers and neuronal cell bodies, using the “freehand selections” tool. As previously explained (Lefèvre *et al.*, 2024), we excluded the longitudinal muscle layer from our analyses because of autofluorescence-related interference from the juxtaposed serosa.

3.4.5 Statistics

Unless otherwise indicated, all experiments were conducted with 3 biological replicates per time point and condition. For each replicate, either 3-5 and/or 6-10 fields of view were analyzed in the myenteric plexus/circular muscle and submucosal plexus, respectively. Detailed information, including sex and the number of counted cells, is provided in Supplementary Data Sheet 1. Quantitative data are presented as mean ± standard deviation (SD), with the value of each imaging field represented by a single dot, except where otherwise indicated in the legend. Statistical comparisons between conditions were carried out in GraphPad Prism 9.5.1, using *t* test (for two groups) and One-Way or Two-Way ANOVA followed by Sidak’s multiple comparison tests (for more than two groups). Correlation analyses were performed by calculating the Pearson coefficient *r* and corresponding *P*-value. The statistical test applied is specified in each figure legend. Data were considered statistically significant when the *P*-value was less than 0.05.

3.5 Results

3.5.1 Emergence of EGC topo-morphological subtypes is altered in the ileal myenteric plexus of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice

To evaluate whether and how EGC diversification could be perturbed in the context of a developmental enteric neuropathy, we first compared the emergence of EGC topo-morphological subtypes in the myenteric plexus and circular muscle of the distal ileum between WT (FVB) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. As per our previously established methodology (Lefèvre *et al.*, 2024), we performed whole-mount immunostaining for pan-glial (SOX10, S100 β) and pan-neuronal (β III-Tubulin) markers. We analyzed three developmental time points (P1, P5, P15) during the postnatal window of EGC diversification (Lefèvre *et al.*, 2024), while also considering the early postnatal mortality of *Nr2f1^{Spt/Spt}* pups (only ~28% survival at P20+) (Bergeron *et al.*, 2016). As described in detail in our prior study (Lefèvre *et al.*, 2024), quantification of relative subtype proportions was mainly based on the location of SOX10+ cells, while also using the gross morphology of S100 β + cells to help resolve ambiguities (*e.g.*, Types I and II at the border of inter-ganglionic fibers). We specifically chose to study the distal ileum segment because ~70% of the colon is aganglionic in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice; the transition zone is located in the proximal colon while the entire ileum is normally colonized by ENS progenitors (Bergeron *et al.*, 2016).

At first glance, myenteric ganglia segregation seems to be accelerated in the distal ileum of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice at P1 and P5 (Figure 3.1A), although this does not affect the final average size of each ganglion at P15 (Figure 3.1B, top panel). However, the neuron:glia ratio is significantly lower in these ganglia at P15 (0.9 ± 0.1 in WT *vs.* 0.6 ± 0.2 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figure 3.1B, bottom panel), mostly because of a drastically reduced abundance of neurons compared to WT (823 ± 129 neurons/mm 2 in WT *vs.* 462 ± 173 neurons/mm 2 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Supplementary Figure 3.1A). Intriguingly, the fact that ganglion size remains nonetheless unaffected in this context can be explained by a commensurate enlargement of these less numerous neurons in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, as we quantified based on anti-HuC/D staining (239 ± 50 μm^2 in WT *vs.* 538 ± 106 μm^2 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Supplementary Figure 3.1B).

Important differences were also noted when analyzing EGC subtypes across the P1-P15 period. At P1, while Type I cells constitute the majority of EGCs in both WT and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, their proportion is significantly lower in the latter ($89 \pm 4\%$ in WT *vs.* $73 \pm 7\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.1A, C, D). This decrease is accompanied by a complementary increase in Type II cells ($9 \pm 4\%$ in WT *vs.* $24 \pm 6\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.1A, C, D). The low proportion of Type III cells remains unchanged ($2-3 \pm 1\%$), while Type IV cells are not present at this perinatal stage (Figures 3.1A, C, D and Supplementary Figure 3.2). At P5, WT mice exhibit an expansion phase for Type III and IV cells, with a concomitant reduction in Type I (Figures

3.1A, C, D and Supplementary Figure 2). Although a comparable increase in Type III is observed in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, Type IV emergence is markedly delayed ($12 \pm 2\%$ in WT vs. $1 \pm 1\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*), and Type II proportion remains elevated compared to WT ($17 \pm 4\%$ in WT vs. $32 \pm 6\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.1A, C, D and Supplementary Figure 2). At P15, *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice exhibit significant alterations in all four topo-morphological subtypes, with higher proportions of both Type I ($43 \pm 7\%$ in WT vs. $52 \pm 13\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) and Type II ($21 \pm 6\%$ in WT vs. $35 \pm 11\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) at the expense of Types III and IV (Figures 3.1A, C, D and Supplementary Figure 2). Although Type III proportions appear similar in both conditions before P15, a decline is now observed in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice ($13 \pm 4\%$ in WT vs. $8 \pm 4\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.1A, C, D). Furthermore, the emergence of Type IV EGCs is still robustly perturbed at this stage ($23 \pm 3\%$ in WT vs. $5 \pm 3\%$ in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.1A, C, D and Supplementary Figure 3.2).

Given that EGC diversification correlates with structural changes within the ENS and circular muscle layer during the early postnatal period (Lefèvre *et al.*, 2024), we investigated whether the noted imbalance in EGC subtypes was accompanied by alterations of relevant morphometric parameters. From the same micrographs used to assess relative EGC proportions, we measured the overall ganglionic surface area, extra-ganglionic space, and inter-ganglionic fiber thickness based on β III-Tubulin expression in the myenteric plexus, as well as circular muscle thickness from immunofluorescence image stacks. Confirming our first impression that ganglia segregation was accelerated in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, we noted significant morphometric changes in the myenteric plexus at P1 and P5. Compared to WT mice, the surface area of both inter-ganglionic fibers and extra-ganglionic space is increased and overall ganglionic area is reduced in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice at these time points (Figures 3.1A and 3.2A). However, as previously noted when measuring average ganglion size (Figure 3.1B), no significant morphometric differences are observed between genotypes at P15 (Figures 3.1A and 3.2A), despite the continued imbalance in the relative proportions of Types I to III (Figures 3.1A, C, D). Additionally, thickening of circular muscle is delayed in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice but is then also similar to WT by P15 (Figure 3.2A), even though Type IV deficits persist (Figures 3.1A, C, D and Supplementary Figure 3.2). In the end, for WT mice, strong correlations can again be observed between age-dependent changes in EGC subtype proportions and morphometric parameters during the P1-P15 period (Figure 3.2B, top panels), as we previously observed during the P1-P20 period (Lefèvre *et al.*, 2024). However, this relationship is weaker in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, as indicated by lower Pearson correlation coefficients and reduced statistical significance across all correlation analyses (Figure 3.2B, bottom panels).

These findings show that in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, the overall sequence of EGC diversification in the myenteric plexus and circular muscle layer is like in WT mice. However, the skewed subtype proportions suggest a

partial defect in the transition from intra-network Types I and II to extra-network Types III and IV. These alterations coincide with perturbed structural maturation, in opposite directions, of the myenteric plexus (accelerated, with fewer but larger neurons) and the circular muscle layer (delayed).

3.5.2 Emergence of EGC topo-morphological subtypes is altered in the ileal submucosal plexus of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice

We next applied the same experimental design to characterize potential alterations in the submucosal plexus of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. Here as well, we first noted that gangliogenesis is perturbed in these animals, but instead of an acceleration as in the myenteric plexus (Figure 3.1A), we observed a delay in the submucosal plexus (Figure 3.3A). Submucosal ganglia of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice become overtly visible at P5 only (Figure 3.3A). Moreover, we found that these ganglia are less numerous and slightly larger in size compared to WT (Figure 3.3A), a persistent defect that we quantified at P15 (Figure 3.3B, top panel). As observed in the myenteric plexus (Figure 3.1B, bottom panel), the neuron:glia ratio is reduced in these submucosal ganglia at P15 (1.8 ± 0.6 in WT vs. 1.3 ± 0.4 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figure 3.3B, bottom panel), again mainly due to a lower than normal abundance of neurons (221 ± 113 neurons/mm² in WT vs. 100 ± 49 neurons/mm² in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Supplementary Figure 3.1C). Moreover, submucosal neurons are also larger in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice compared to WT (182 ± 42 µm² in WT vs. 412 ± 101 µm² in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Supplementary Figure 3.1D).

As expected from the gangliogenesis defect described above, we observed a commensurate delay in the expansion of submucosal Type I EGCs in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice between P1 and P5 ($14 \pm 9\%$ at P1 to $27 \pm 9\%$ at P5 in WT vs. $0.3 \pm 1\%$ at P1 to $8 \pm 8\%$ at P5 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*), a delay that is later resolved by P15 (Figures 3.3A, C, D). Type II cells are systematically the most abundant subtype in the submucosal plexus of WT mice before P20 (Lefèvre *et al.*, 2024), regardless of the time-point investigated, and this is still the case in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice (Figures 3.3A, C, D). Yet, while the relative proportion of Type II EGCs was found to decrease throughout the analysis period, as Types I and III are gradually generated, it constantly appears higher in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice compared to WT mice ($75 \pm 9\%$ at P1 to $41 \pm 9\%$ at P15 in WT vs. $92 \pm 9\%$ at P1 to $48 \pm 12\%$ at P15 in *Nr2f1^{Spt/Spt}*) (Figures 3.3A, C, D). However, no significant differences were observed for the expansion of Type III cells between P1 and P15 (Figures 3.3A, C, D).

The larger size of individual submucosal ganglia in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice (Figure 3.3B, top panel) most likely explains why the proportion of Type I EGCs in these animals eventually reaches WT levels at P15 (Figures 3.3A, C, D), even though these ganglia are less numerous and hence overall ganglionic area is smaller from P1 to P15 (Figure 3.4A). Intriguingly, despite a higher proportion of Type II EGCs in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice compared to WT at every time point, fiber area is either slightly reduced (at P1) or undistinguishable from

WT (at P5 and P15) (Figure 3.4A). Nonetheless, for both Type I and II EGCs, correlations between relative subtype proportions and relevant morphometric parameters are as strong in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice as they are in WT mice (Figure 3.4B). As expected, the altered gangliogenesis leads to a slightly increased extraganglionic area in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice over the P1-P15 period (Figure 3.4A). However, we found no correlation between this morphometric parameter and the proportion of Type III EGCs neither in *Nr2f1^{Spt/Spt}* nor in WT mice (Figure 3.4B), in contrast to what we had previously observed in WT mice during the extended P1-P20 period (Lefèvre *et al.*, 2024).

In sum, the accumulation of Type II cells and delayed expansion of Types I and III in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice support the hypothesis that Type II EGCs act as a local source for the other subtypes in the submucosal plexus. The submucosal plexus of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice also shows signs of adaptive compensation to an initial delay in gangliogenesis, again including fewer but larger neurons as observed in the myenteric plexus. Such adaptative compensation most likely contributes to maintaining strong correlations between the proportions of Type I and II EGCs and their associated morphometric parameters in the submucosal plexus.

3.5.3 Post-natal adaptative compensation in the ileal ENS of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice includes a cell population with mixed neuronal-glial identity and an increased contribution by SCPs

While using anti-S100 β immunofluorescence to clarify EGC subtype identity, we noticed that this glial marker was also often present in neuronal-like ganglion cells of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice from P5 onwards, and most especially in the myenteric plexus (Supplementary Figure 3.3). In the distal ileum of WT mice at P5, S100 β expression is normally restricted to EGCs with SOX10+ nuclei, in both myenteric and submucosal ganglia (Figure 3.5 and Supplementary Figure 3.3). However, in the same region of age-matched *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, several S100 β + ganglion cells do not stain positive for SOX10 (Supplementary Figure 3.3). As best evidenced in the myenteric plexus, the anti-S100 β immunofluorescence signal is brighter in these SOX10-negative cells than in SOX10+ cells (Figure 3.5 and Supplementary Figure 3.3). Such bright S100 β + but SOX10-negative ganglion cells were rarely observed in WT mice, only in the submucosal plexus at the later P15 time-point (Supplementary Figure 3.3B).

As previously reported by others in different contexts (Grundmann *et al.*, 2016; Parathan *et al.*, 2020), S100 β + ganglion cells negative for SOX10 in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice can be immunolabeled with the pan-neuronal marker HuC/D (Figure 3.5). Our quantitative analyses in the myenteric plexus at P5, when and where these cells first appear in sufficient numbers, indicate that they constitute 14 ± 6% of total HuC/D+ neurons (Figure 3.5A). We also found that myenteric S100 β + HuC/D+ neuronal-like cells are slightly larger in size compared to neighbor HuC/D+ neurons that are negative for S100 β , or to those of WT mice (Figure 3.5A),

suggesting a preferential contribution to the global increase in neuron size previously noted at P15 (Supplementary Figures 3.1B, D).

To evaluate the possibility that these S100 β + HuC/D+ neuronal-like cells could be specifically derived from SCPs, we turned to a genetic cell lineage tracing approach based on the *Dhh-Cre* driver (Jaegle *et al.*, 2003) that we and others have successfully used in prior studies (Bonnamour *et al.*, 2022; Bonnamour *et al.*, 2021; Soret *et al.*, 2020; Uesaka *et al.*, 2015). As we previously validated in the developing ENS before birth (Lefèvre *et al.*, 2024), when *Dhh-Cre* is used in conjunction with a Cre reporter allele like *Rosa26*^{[FloxedSTOP]YFP} (Srinivas *et al.*, 2001), it allows to specifically label SCPs on extrinsic nerves and none of the intrinsic ENS cells derived directly from NCCs. Our analysis of *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *Rosa26*^{[FloxedSTOP]YFP/+}; *Nr2f1*^{Spt/Spt} triple-transgenics at the same P5 stage as above revealed a heterogeneous contribution of SCPs to the pool of S100 β + HuC/D+ neuronal-like cells, with high variability among myenteric ganglia (Figure 3.5B). With 22 ± 21% of S100 β + HuC/D+ neuronal-like cells also positive for YFP in the *Nr2f1*^{Spt/Spt} background, SCPs do contribute but clearly not exclusively (Figure 3.5B).

Importantly, the same cell lineage tracing approach also allowed us to evaluate the overall SCP contribution to EGC diversification in the *Nr2f1*^{Spt/Spt} background. Once again, we limited these analyses to the P5 stage – which, in any case, is almost impossible to go beyond considering the low yield of multi-allele crosses that now added to the high death rate (~72%) of *Nr2f1*^{Spt/Spt} animals before weaning age (Bergeron *et al.*, 2016). In both plexuses, we observed robust increases of the SCP contribution to the overall pool of EGCs (Figure 3.6), with respective variations peaking at ~6X in the myenteric plexus (4 ± 4% in controls vs. 25 ± 11% in *Nr2f1*^{Spt/Spt} background; Figure 3.6A) and ~3X in the submucosal plexus (13 ± 11% in controls vs. 39 ± 20% in *Nr2f1*^{Spt/Spt} background; Figure 3.6B). In each case, the global increase is not equally distributed among the different EGC subtypes (Figure 3.6 and Supplementary Figure 3.4), mostly aligning with the skewed proportions already noted at P5 in favor of Types I/II in the myenteric plexus and Type II in the submucosal plexus (Figures 3.1C and 3.3C).

All these data are consistent with the notion that multiple compensatory mechanisms can be spontaneously turned on in the early postnatal ENS to help adapt and/or circumvent developmental anomalies. In the distal ileum of *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice, this includes an atypical contribution by S100 β + HuC/D+ neuronal-like cells and a globally increased contribution of SCPs.

3.6 Discussion

For the current study, we hypothesized that the *Nr2fl^{Spt/Spt}* mouse model of Waardenburg syndrome Type IV (Bergeron *et al.*, 2016; Bonnamour *et al.*, 2022; Pilon, 2021), in which enteric gliogenesis is prematurely engaged during prenatal development (Bergeron *et al.*, 2016; Charrier et Pilon, 2017), could also provide useful insights into the diversification process of EGCs during the early postnatal period (P1-P15). We specifically selected the distal ileum from these mice as a region of interest to analyze the spatiotemporal acquisition of EGC subtype diversity in both the myenteric and submucosal plexuses. This specific bowel segment was chosen to compare with our previous analysis of EGC diversification in pre-weaned WT mice (Lefèvre *et al.*, 2024) – which included both the distal ileum and distal colon – despite extensive colonic aganglionosis in *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice placing the hypoganglionic transition zone in the proximal colon (Bergeron *et al.*, 2016). Still based on our prior analysis of WT mice (Lefèvre *et al.*, 2024), we also considered the structural changes that occur during the early postnatal period as well as the contribution of SCPs to each EGC subtype. As discussed in more detail below, our new data in *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice corroborate the hierarchical mode of spatiotemporal EGC diversification previously inferred from our analysis of WT mice, while also highlighting the great developmental plasticity of the immature ENS after birth.

The hierarchical mode of EGC diversification that we previously proposed based on detailed spatiotemporal data from WT mice stipulated that intra-network Type I/II EGCs from the myenteric plexus constitute the source of extra-network Type III and IV EGCs, as well as Type II EGCs in the submucosal plexus which then also contribute to submucosal Type I and III EGCs (Lefèvre *et al.*, 2024). As we were hoping, similar spatiotemporal analysis of EGC diversification in *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice proved to be informative in that it lends more credence to this hypothetical model. Indeed, in both plexuses of these mutant mice, the expansion of “secondary” EGC subtypes (*i.e.*, myenteric Types III/IV and submucosal Types I/III) at the expense of “primary” EGC subtypes (*i.e.*, myenteric Types I/II and submucosal Type II) is significantly delayed compared to WT mice. Morphometric parameters previously suggested as influencing acquisition of EGC diversity also remain largely correlated with their respective associated EGC subtype in *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice, although such correlations are weaker in the myenteric plexus. In contrast, the contribution of SCPs to EGC diversification was found to differ from what we previously observed in WT mice. Our data for SCP-derived EGCs in *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice are nonetheless in agreement with the general idea that SCPs can somehow sense and adapt to the pre-existing composition of the ENS, as previously reported for enteric neurons (Uesaka *et al.*, 2021).

Unexpectedly, although the distal ileum of *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice appears to be fully colonized by neural crest-derived ENS progenitors before birth (Bergeron *et al.*, 2016), gangliogenesis was found to be significantly

altered in both plexuses. While the noted defects were initially found to differ in a temporal manner (accelerated for myenteric ganglia *vs.* delayed for submucosal ganglia), we then noted striking similarities in the accompanying neuronal abnormalities. In both ganglionic networks, markedly reduced neuron numbers are compensated for by a commensurate increase in the average size of individual neurons, so that the overall ganglionic surface area in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice eventually becomes similar (in the myenteric plexus) or close (in the submucosal plexus) to WT levels at the latest investigated time-point (P15). The decreased neuronal abundance makes sense considering that gliogenesis is favored during prenatal ENS formation in *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice (Bergeron *et al.*, 2016). The fact that these less abundant neurons become larger is much more surprising. To the best of our knowledge, this has not been reported in any context other than aging (Nguyen *et al.*, 2023). While aging-associated hypertrophy of enteric neurons is believed to alter their function (Nguyen *et al.*, 2023), it is tempting to speculate that this is the converse in the developmental context of *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. If accompanied by a proportional increase of relevant subcellular and molecular attributes, larger neurons could process more information more efficiently, as previously suggested in the CNS (Goriounova *et al.*, 2018). Hence, having such “enhanced” neurons could be an adaptative way for the ENS to prevent functional impairment despite lower neuronal density. Clearly, this unexpected discovery raises a lot of neuron-oriented questions for future work, far beyond the scope of the current study focused on EGCs.

Regardless of the mechanism(s) responsible for the aforementioned neuronal defect, the consequence of a decrease in the number of neurons might well be the reason for the alteration in the cascade of EGC diversification from the myenteric plexus. The reduced abundance of myenteric neurons could somehow force Type I EGCs with neurogenic potential (Guyer *et al.*, 2023; Mueller, Jessica L. *et al.*, 2024) to replenish the neuronal pool within myenteric ganglia instead of contributing to extra-ganglionic Type III and IV EGCs. This hypothesis is supported by our own observations of HuC/D+ neuronal-like cells also positive for the EGC marker S100 β in these ganglia as well as by other studies suggesting that Type I EGCs are the most neurogenic EGC subtype (Mueller, Jessica L. *et al.*, 2024). Interestingly, the presence of HuC/D+ S100 β + neuronal-like cells has also been observed during normal early postnatal ENS development in WT mice (Grundmann *et al.*, 2016; Parathan *et al.*, 2020), most especially in the small intestine but excluding the distal ileum (Grundmann *et al.*, 2016). This suggests that EGC-derived neurogenesis is an inherent property of the developing ENS soon after birth that, if needed, can spontaneously be activated in bowel segments not necessarily prone to it normally. Moreover, studies in mouse models of ulcerative colitis (Belkind-Gerson *et al.*, 2017) and Chagas disease (Khan *et al.*, 2024) even suggest that this potential is maintained later in life and may manifest itself during the remission phase of these diseases.

The reduced abundance of neurons in the distal ileum of *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice is also likely the reason for the increased contribution of SCPs to the general pool of EGCs. A similar result has been previously reported for SCP-derived neurons in the hypoganglionic transition zone of *Sox10^{Venus/+}* and *Ednrb^{-/-}* mouse models of Hirschsprung disease, just upstream of the aganglionic segment (Uesaka *et al.*, 2021). The increased contribution by SCPs in these models was exclusively detected in the hypoganglionic region, being otherwise very low in the upstream ganglionated (neuron-rich) region or downstream aganglionic (neuron-devoid) one (Uesaka *et al.*, 2021). Although the distal ileum of *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice is not hypoganglionic *per se* from a structural point of view, it does contain fewer neurons than normal and hence likely corresponds to the transition zone in the other genetic models mentioned above. Collectively, these observations suggest that reduced neuron density, but not their absence, is really the trigger of the increased SCP contribution to the ENS, independently of the underlying genetic defects. To further verify this hypothesis, we also analyzed neuronal density, neuron:glia ratio and SCP contribution in the distal ileum of heterozygous *Nr2fl^{Spt/+}* mice. Strikingly, this analysis revealed an increased contribution of SCPs to the EGC pool specifically in the submucosal plexus where there are fewer neurons than normal, and not in the myenteric plexus where neuronal density is similar to WT mice (Supplementary Figure 3.5).

In conclusion, our work positions the distal ileum of *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice as an exciting playground not only to better understand EGC diversification but also to study adaptative compensation and developmental plasticity within the ENS. While the notion of a hierarchical mode of EGC diversification under the influence of structural changes has been strengthened, our findings show that the SCP contribution is more flexible than initially thought, being adaptable as a function of the tissue environment (where neuron density is a primary factor). Future work along these lines will certainly be helpful to better understand and/or improve ENS-regenerative therapies that are currently being developed based on either transplantation or *in situ* stimulation of EGCs and SCPs (Gary *et al.*, 2025; Mueller, Jessica L. *et al.*, 2024; Pan *et al.*, 2022; Soret *et al.*, 2020).

3.7 Conflict of Interest

RS and NP are co-founders of the biotech company Neurenati Therapeutics, which had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

3.8 Author Contributions

Conceived and Supervised the study: RS and NP. Designed the experiments: MAL, RS and NP. Performed the experiments: MAL and MB. Analyzed the data: MAL, RS and NP. Wrote the paper: MAL (original draft), RS (review), and NP (review and editing). All authors read and approved the final manuscript.

3.9 Funding

This work was funded by grants from the Natural Sciences and Engineering research Council of Canada to NP (#RGPIN-2019-07076) and RS (# RGPIN-2024-05777), and the Consortium Québécois de Découverte du Médicament to NP (#SYN-329).

3.10 Acknowledgments

The authors would like to thank Grégoire Bonnamour from the Cellular analyses and Imaging core (CERMO-FC, UQAM) for assistance with confocal imaging.

3.11 Data availability Statement

All relevant data are within the manuscript and its Supplementary Material files.

3.12 Table and figures

GENE	SENSE PRIMER	ANTISENSE PRIMER
Rosa26-YFP	5'CCCAAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC3'	YFP: 5'TGCGCCCTACAGATCCCTTAATTAA3'
Dhh-Cre	5'GATGAGGTTCGCAAGAACCTGATG3'	5'AACAGCATTGCTGTCACTGGTCG3'
Nr2f1^{Spt/+}	5'TTTGTGGCTGTAAAGATTGACTCC3'	Mutant: 5'TTTAGCAAATCCCAGTCATTCTTAG3' WT: 5'TTAGGTCCTGGAGTCTGGTTAGTT3'

Table 3.S1 : Oligonucleotide primers used for genotyping.

ANTIBODY	SOURCE	HOST SPECIES	DILUTION
SOX10	R&D Systems, #AF2864	Goat	1:500
S100β	Novus Biologicals, #NBP1-41373SS	Rabbit	1:500
βIII-Tubulin	Abcam, #ab78078	Mouse	1:500
Green Fluorescent Protein (GFP)	Abcam, #ab290	Rabbit	1:500
Green Fluorescent Protein (GFP)	Abcam, #ab5450	Goat	1:500
HuC/HuD	ThermoFisher, #A-21271	Mouse	1:500
AlexaFluor 594 Anti-rabbit	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 711-585-152	Donkey	1:500
AlexaFluor 647 Anti-mouse	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 715-605-150	Donkey	1:500
AlexaFluor 488 Anti-goat	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, 805-545-180	Bovine	1:500

Table 3.S2. Primary and secondary antibodies used for immunofluorescence.

Figure 1

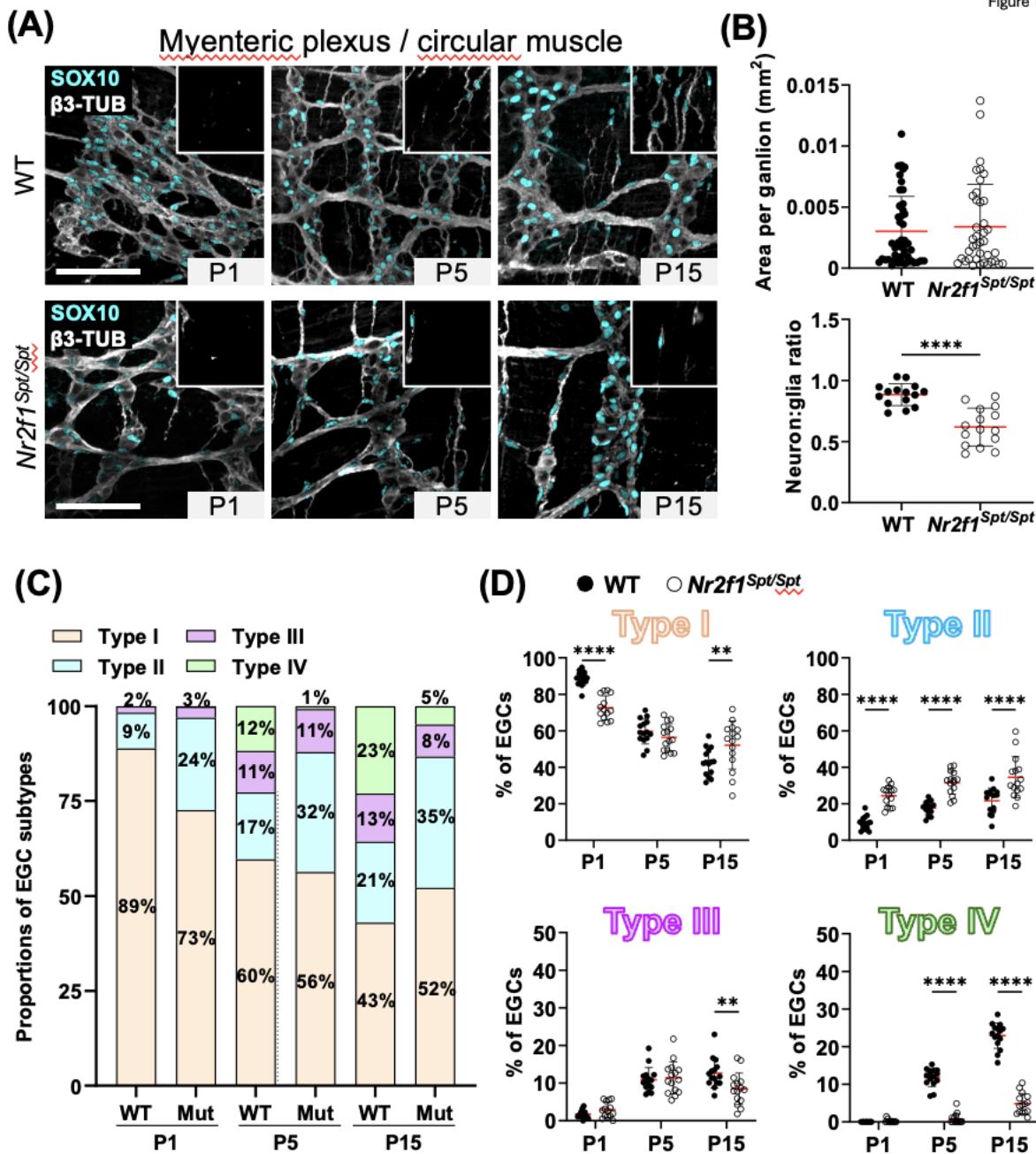


Figure 3.1 Analysis of EGC diversification in the postnatal myenteric plexus and circular muscle layer of the distal ileum from WT and *Nr2f1Spt/Spt* mice.

(A) Immunofluorescence analysis of the myenteric plexus and associated circular muscle layer (insert at the top right) in the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, at indicated postnatal ages (P1, P5 and P15). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m. (B) Quantitative analysis of the area per ganglion (mm^2 , each dot represents a ganglion, n=39-48 ganglia) and the neuron:glia ratio (total neurons:total Type I EGCs, each dot represents a single 60x field of view) in the myenteric plexus of wild-type FVB and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice at P15 (N=3 mice ; n=5 60x fields of view). (C-D) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Types I to IV, in the myenteric plexus and the circular muscle layer of wild-type FVB (black dots) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* (white dots) mice, using images such as those displayed in panel A (N=3 mice per time point; n=5 60x fields of view per animal). **P \leq 0.01, ****P \leq 0.0001; t test (B), Two-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test (D).

Figure 2

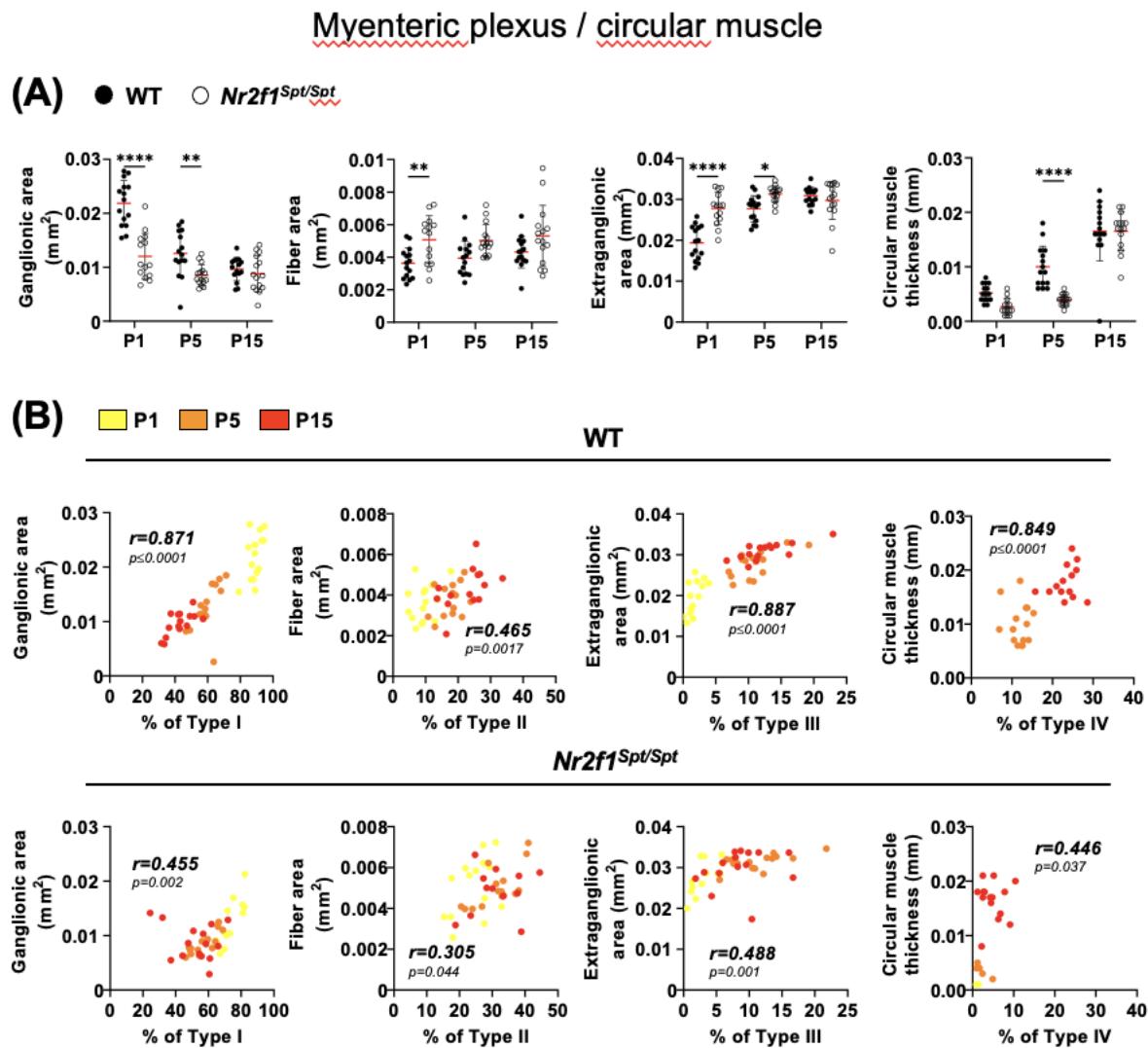


Figure 3.2 Analysis of structural maturation of the postnatal myenteric plexus and circular muscle layer in the distal ileum of WT and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice.

(A) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area, interganglionic fiber surface area and circular muscle thickness) in the distal ileum from wild-type FVB (black dots) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* (white dots) mice as a function of age during the early postnatal period (P1, P5 and P15). (B) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, Type III proportion and extraganglionic area, and Type IV proportion and circular muscle thickness, in wild-type FVB (top panels) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* (bottom panels) mice. Colored symbols correspond to the indicated time points. r, Pearson's correlation coefficient. **P≤0.01, ****P≤0.0001; Two-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test (A).

Figure 3

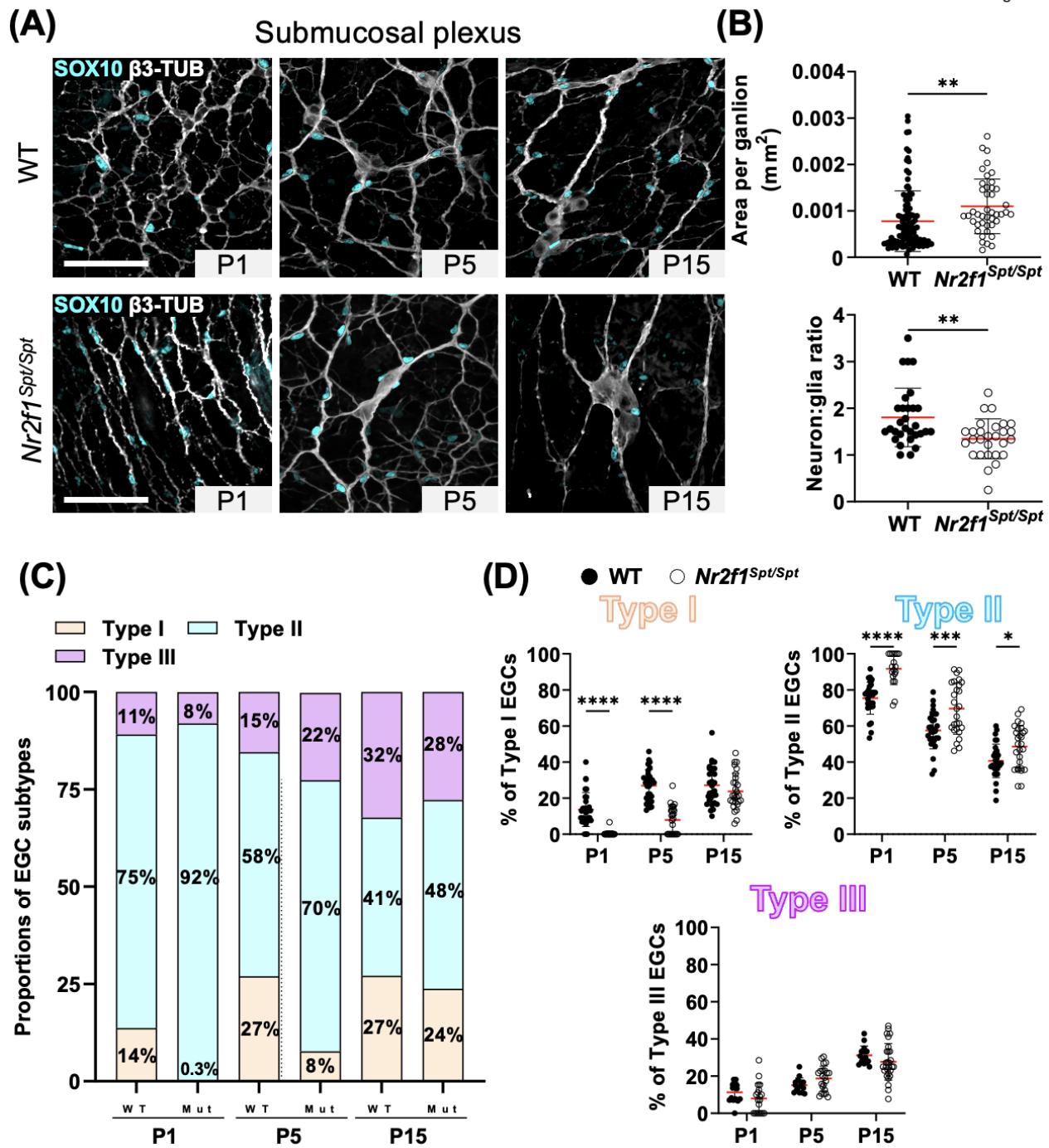


Figure 3.3 Analysis of EGC diversification in the postnatal submucosal plexus of the distal ileum from WT and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice.

(A) Immunofluorescence analysis of the submucosal plexus in the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice, at indicated postnatal ages (P1, P5 and P15). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m.

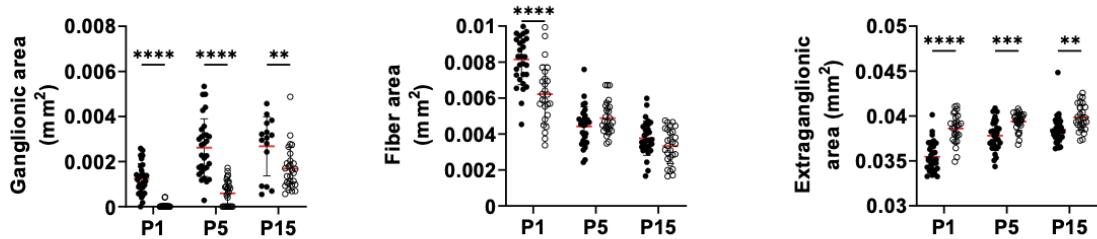
(B) Quantitative analysis of the area per ganglion (mm^2 , each dot represents a ganglia, n=43-111) and the neuron:glia ratio (total neurons:total Type I EGCs, each dot represents a single 60x field of view) in the myenteric plexus of wild-type FVB and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice at P15 (N=3 mice ; n=8-10 60x fields of view).

(C-D) Quantitative analysis of the relative proportions of EGC Types I to IV, in the myenteric plexus / circular muscle layer of wild-type FVB (black dots) and *Nr2fl^{Spt/Spt}* (white dots) mice, using images such as those displayed in panel A (N=3 mice per time point; n=8-10 60x fields of view per animal). *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001; t test (B), Two-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test (D).

Figure 4

Submucosal plexus

(A) ● WT ○ *Nr2f1^{Spt/Spt}*



(B) ■ P1 ■ P5 ■ P15

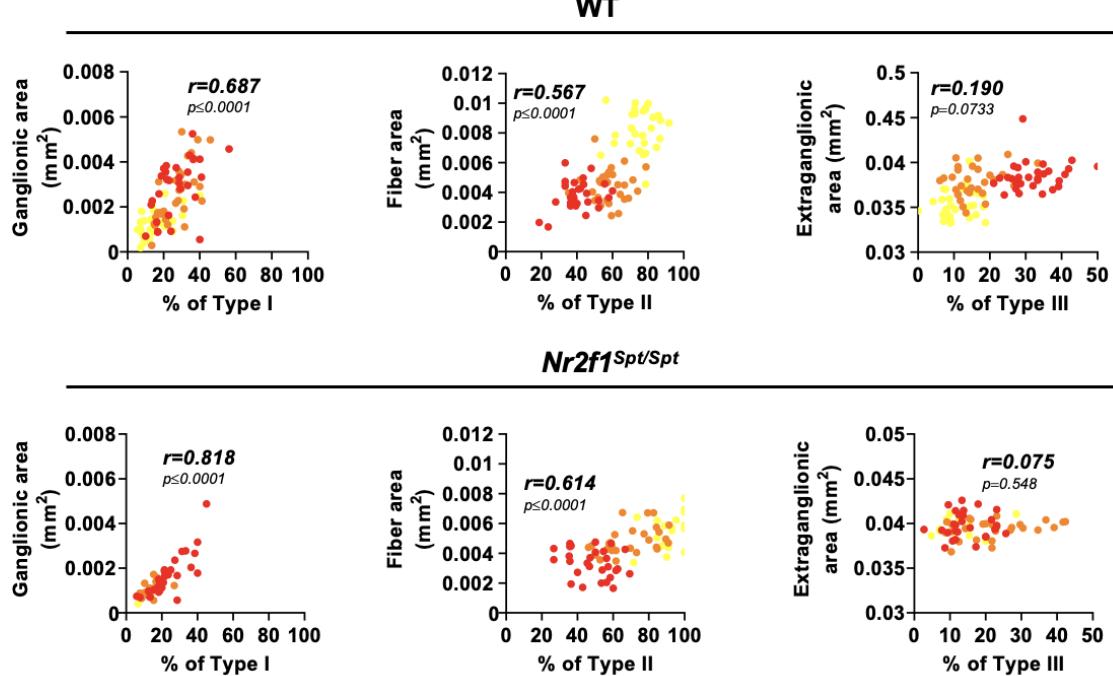


Figure 3.4 Analysis of structural maturation of the postnatal submucosal plexus in the distal ileum of WT and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice.

(A) Quantitative analysis of indicated morphometric parameters (ganglionic surface area, extraganglionic surface area and interganglionic fiber surface area) in the distal ileum from wild-type FVB (black dots) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* (white dots) mice as a function of age during the early postnatal period (P1, P5 and P15). (B) Correlation analysis (excluding 0% and 100% values; incompatible with proportion calculations) between Type I proportion and ganglionic area, Type II proportion and interganglionic fiber area, Type III proportion and extraganglionic area, in wild-type FVB (top panels) and *Nr2f1^{Spt/Spt}* (bottom panels) mice. Colored symbols correspond to the indicated time points. r, Pearson's correlation coefficient. **P≤0.01, ***P≤0.001, ****P≤0.0001; Two-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test (A).

Figure 5

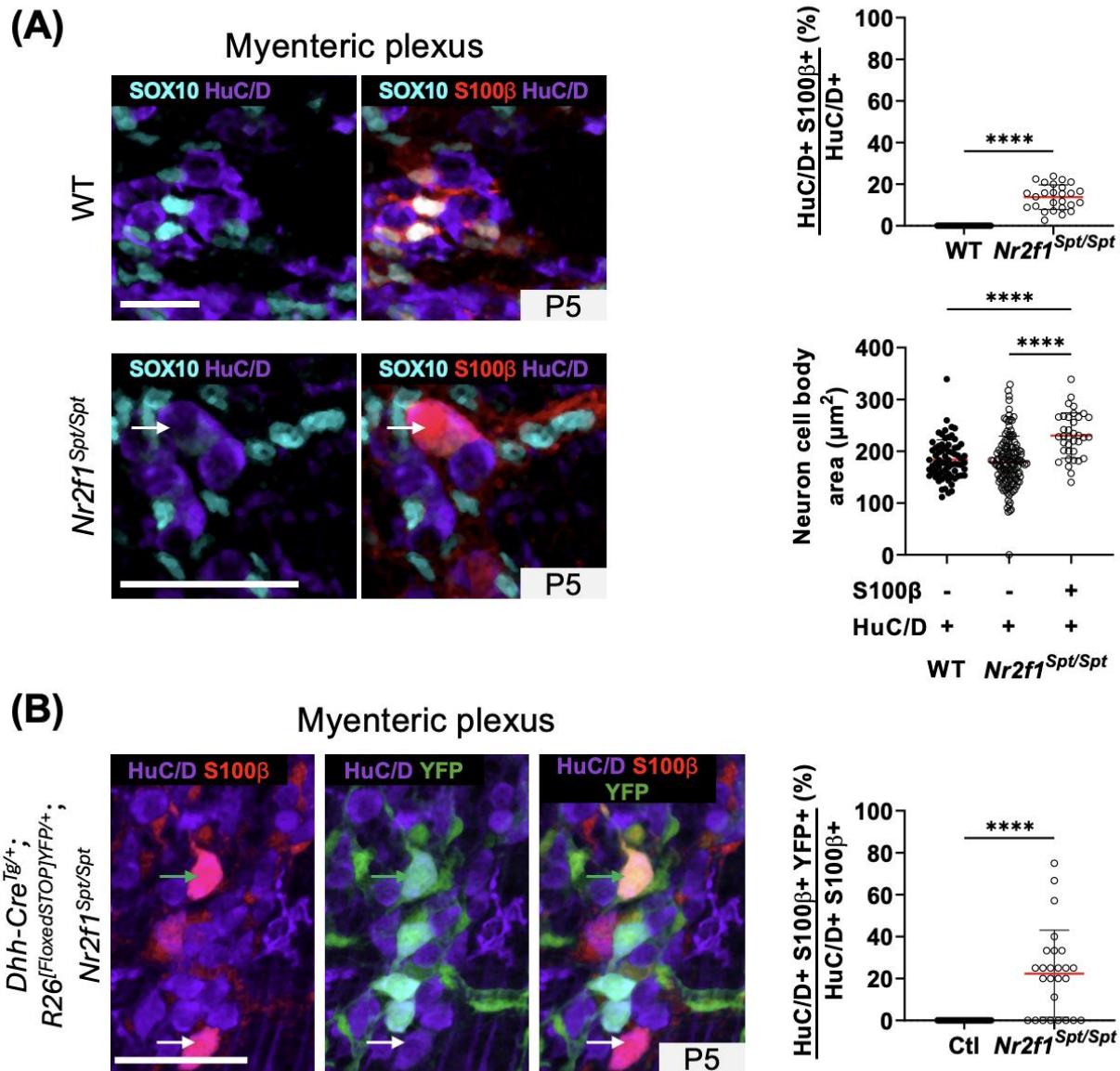
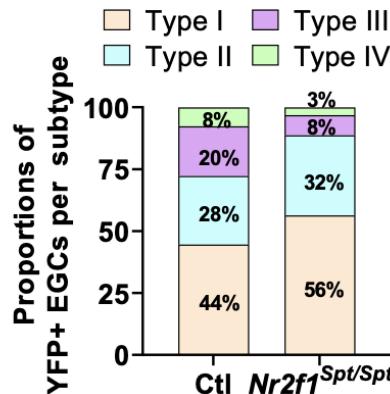
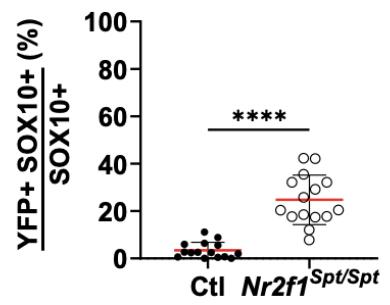
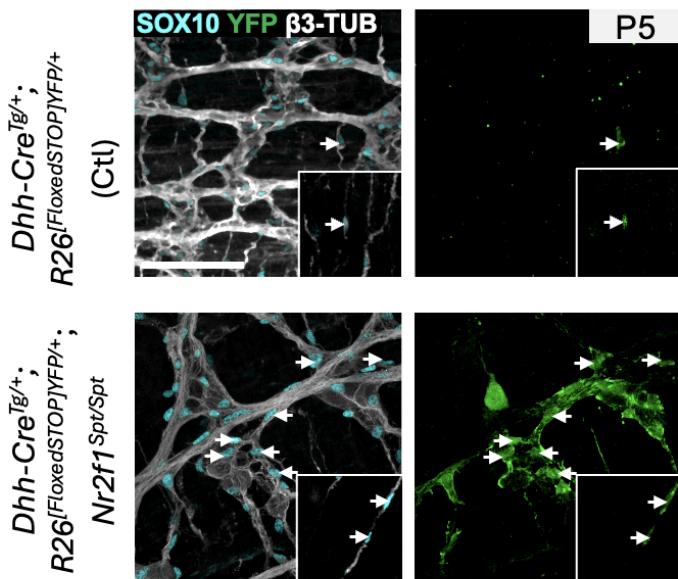


Figure 3.5 Analysis of the S100 β + HuC/D+ cell population in the myenteric plexus of the distal ileum from WT and *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice.

(A) Immunofluorescence analysis of S100 β expression pattern in the myenteric plexus of the distal ileum from P5 wild-type FVB and *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice (left panels), and accompanying quantitative analyses (right panels). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against the pan-glial marker SOX10 (cyan), the pan-neuronal marker HuC/D (purple) and S100 β (red). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice. Scale bar, 70 μ m. The top right panel shows the quantitative analysis of HuC/D+ S100 β + proportion, where each dot represents the percentage of HuC/D+ S100 β + over the total of HuC/D+ neurons in a single 60x field of view (N=3 mice; n=5 60x fields of view). Bottom right panel shows the quantitative analysis of cell body area of HuC/D+ S100 β +- cells, where each dot represents a single cell body area (N=2 mice; 5 60X fields of view per animal; n=70-136 cell bodies measured in total). (B) Immunofluorescence analysis of the SCP contribution (YFP+) to HuC/D+ S100 β + cell population, in the myenteric plexus of the distal ileum from P5 *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice (left panels), and accompanying quantitative analysis (right panel). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against the pan-neuronal marker HuC/D (purple), S100 β (red) and GFP/YFP for SCP-derived cells (green). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice. Scale bar, 70 μ m. The quantitative analysis shows the proportion of HuC/D+ S100 β + cells that are also positive for YFP in control *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *Rosa26*^{FloxedSTOPYFP/+} and *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *Rosa26*^{FloxedSTOPYFP/+}; *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice, with each dot representing the percentage of HuC/D+ S100 β + YFP+ over the total of HuC/D+ S100 β + cells in a single 60x field of view (N=3 mice; n=6-11 60X fields of view). ****P≤0.0001; t test (% analyses), Two-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test (Cell body area analysis).

Figure 6

(A) Myenteric plexus / Circular muscle



(B) Submucosal plexus

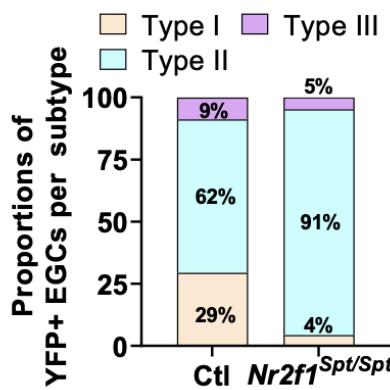
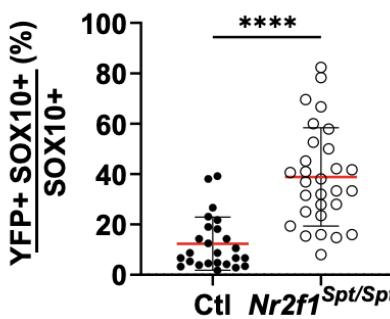
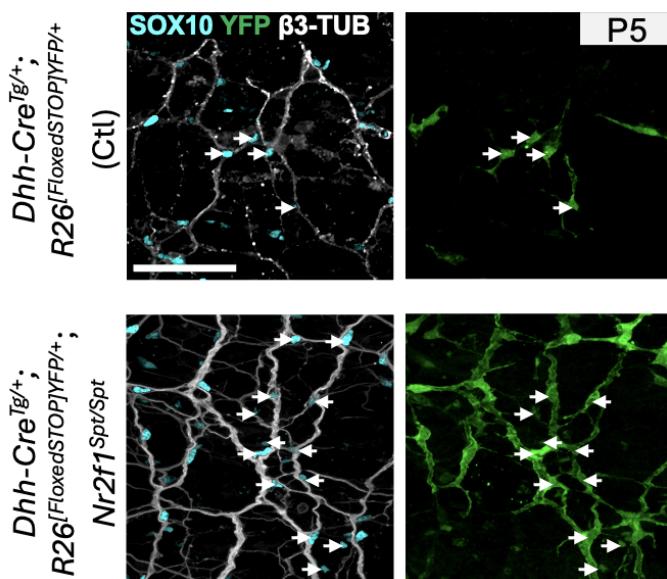
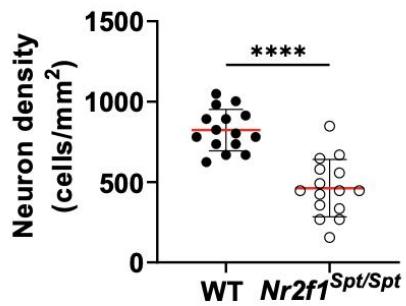


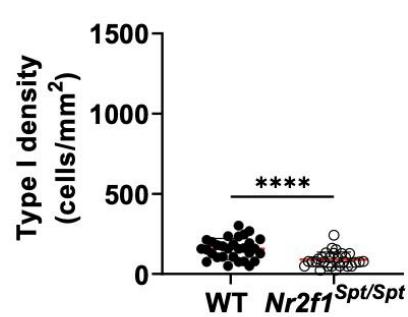
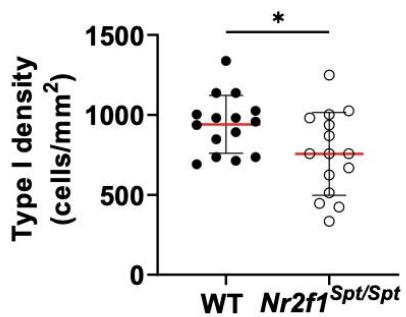
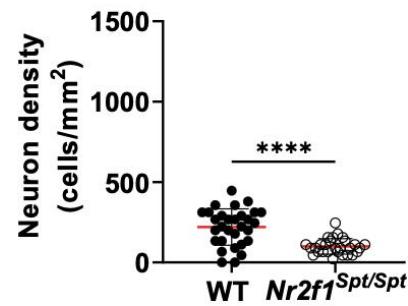
Figure 3.6 Analysis of the SCP contribution to EGC diversification in the distal ileum of control and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice.

(A-B) Immunofluorescence analysis of the SCP contribution (YFP+) to EGC diversification in the myenteric plexus / circular muscle layer (A) and the submucosal plexus (B) of the distal ileum from P5 control *Dhh-Cre^{Tg/+};R26^{FloxedSTOPYFP/+}* (Ctl) and *Dhh-Cre^{Tg/+};R26^{FloxedSTOPYFP/+};Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, and accompanying quantitative analyses. Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan), GFP/YFP for SCP-derived cells (green) and βIII-Tubulin for neuronal fibers (grey). White arrows point to YFP+ cells derived from SCPs. Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice. Scale bar, 70 μm. Quantitative analyses show the SCP contribution to the global pool of EGCs (percentage of YFP+ SOX10+ EGCs among all SOX10+ EGCs, top panels) and the SCP contribution per EGC subtype (bottom panels) (N=3 mice; n=5 fields of view per tissue for the myenteric plexus/muscular layer; n= 10 fields of view per tissue for the submucosal layer). ****P≤0.0001; t test.

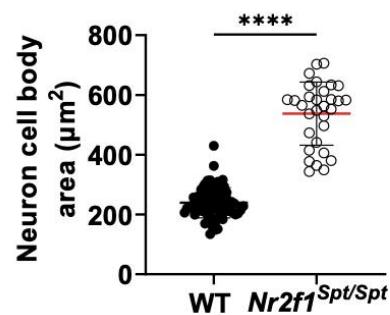
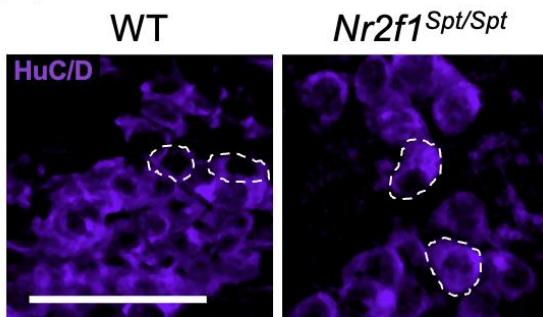
(A) Myenteric ganglia



(C) Submucosal ganglia



(B)



(D)

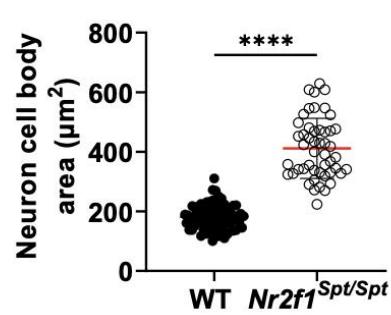
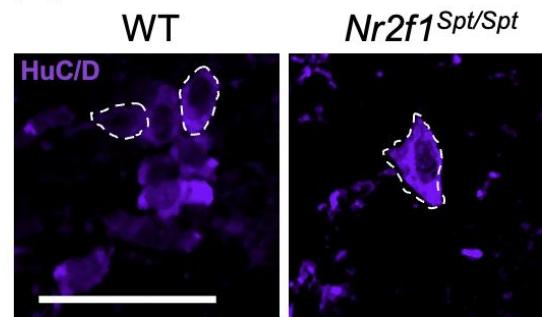


Figure S3.1 Analysis of cell density and neuronal cell body area in myenteric and submucosal ganglia of the distal ileum from WT and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice at P15.

(A, C) Quantitative analysis of neuronal and Type I EGC density in myenteric (A) and submucosal (C) ganglia of the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice (N=3 mice per time point; n=5-10 60X fields of view per animal). (B, D) Immunofluorescence analysis of myenteric (B) and submucosal (D) HuC/D+ neurons in the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2fl^{Spt/Spt}* mice, and accompanying quantitative analysis of cell body area. Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice. Scale bar, 70 μ m. Each dot of the quantitative analysis represents a single cell body area (N=2-3 mice; 4-10 60X fields of view per animal; n=31-76 cell body measured in total). *P≤0.05, ****P≤0.0001; t test.

Figure S2

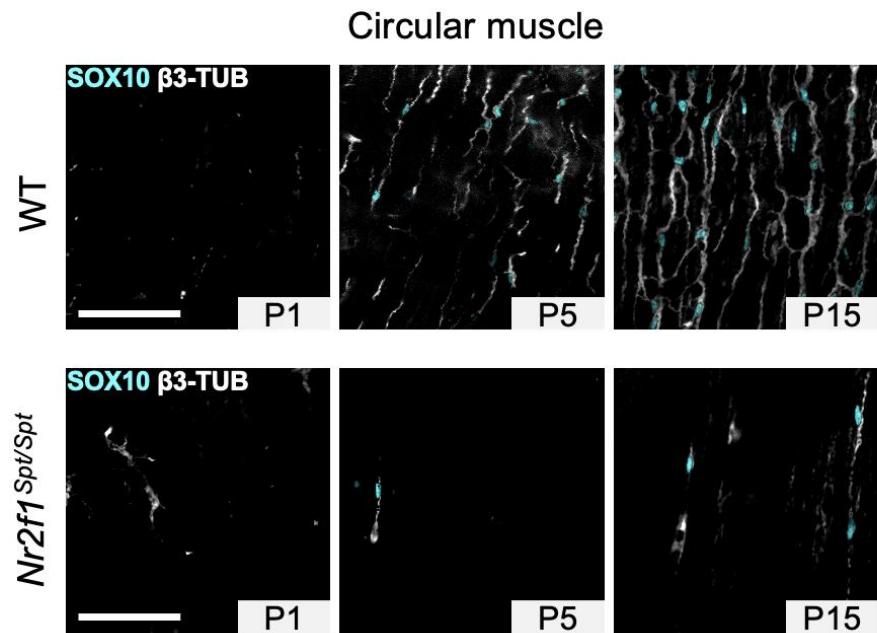


Figure S3.2 Immunofluorescence analysis of Type IV emergence in the circular muscle layer of the distal ileum from WT and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice.

Representative images of the circular muscle layer of the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2f1^{Spt/Spt}* mice, at indicated postnatal ages (P1, P5 and P15). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan) and β III-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m.

Figure S3

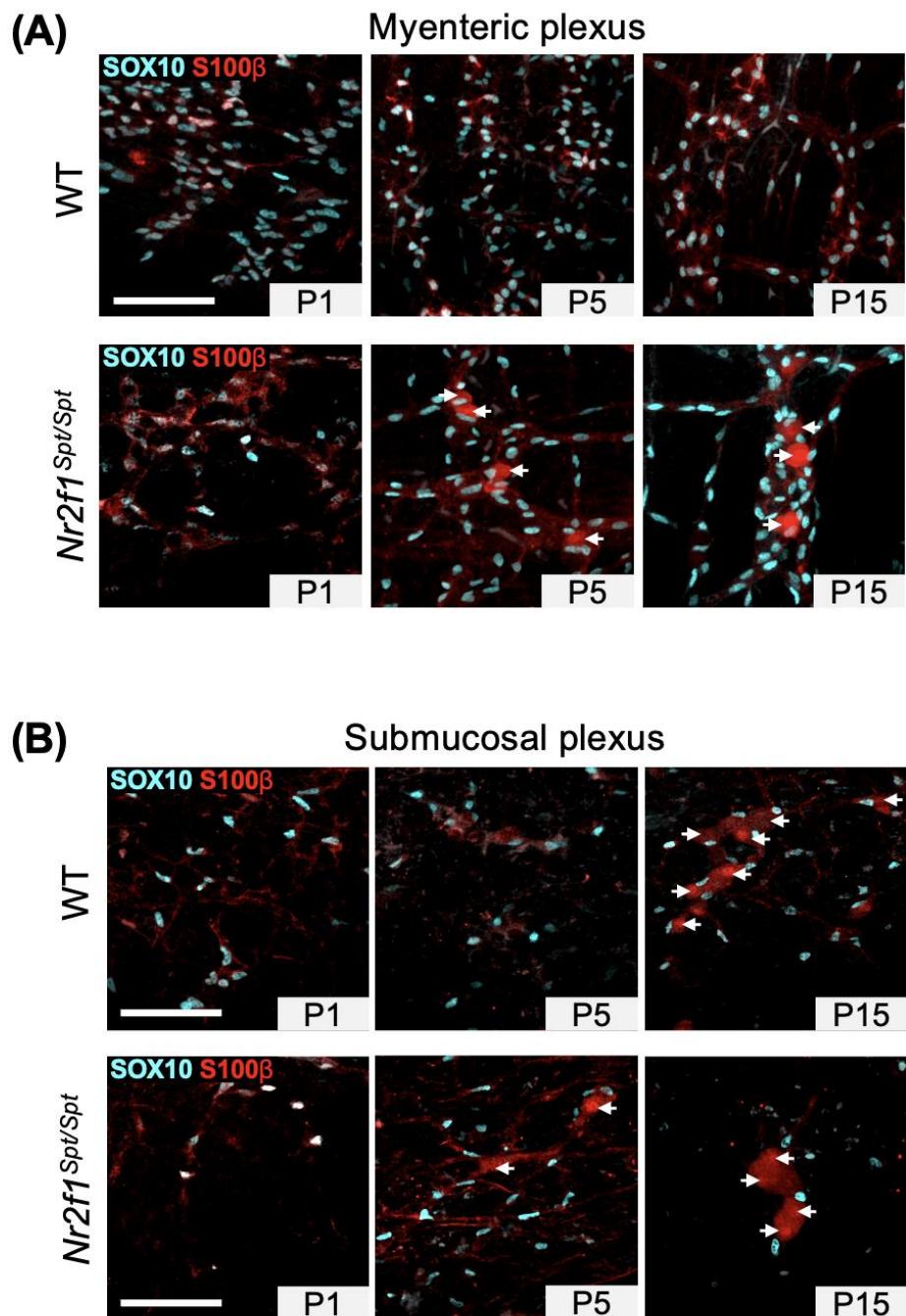


Figure S3.3 S100 β expression pattern in myenteric and submucosal plexuses of the distal ileum from WT and *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice.

(A-B) Representative images showing the expression pattern of the glial marker S100 β in myenteric (A) and submucosal (B) plexuses of the distal ileum from wild-type FVB and *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice, at indicated postnatal ages (P1, P5 and P15). Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 (cyan) and S100 β (red). White arrows point to cells with a neuron-like morphology that express S100 β . Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μ m.

Figure S4

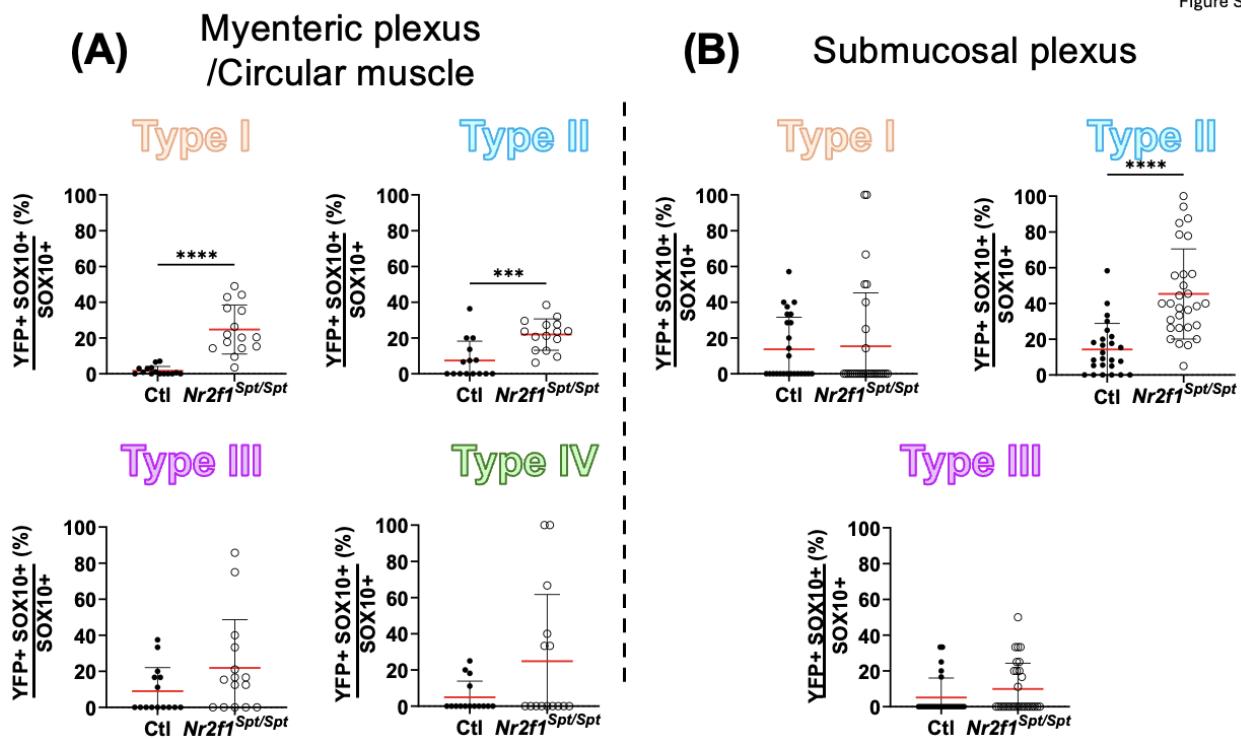


Figure S3.4 Contribution of SCPs to topo-morphological EGC subtypes, detailed per sample.

(A-B) Quantitative analysis of the proportion of YFP+ SOX10+ EGCs among total SOX10+ Type I, II, III or IV EGCs in the myenteric plexus/circular muscle (A) and the submucosal plexus (B) of the distal ileum from P5 control *Dhh-Cre^{Tg/+}; R26^{floxiedSTOPYFP/+}* (Ctl) and *Dhh-Cre^{Tg/+}; R26^{floxiedSTOPYFP/+}; Nr2f1^{Spt/Spt}* mice. Each dot represents the percentage of YFP+ SOX10+ EGC Types I, II, III or IV in a single 60X field of view (N=3 mice per time point, n=5 fields of view per tissue for the myenteric plexus/muscular layer; n= 6-10 fields of view per tissue for the submucosal layer)., ***P≤0.001, ****P≤0.0001; t test.

Figure S5

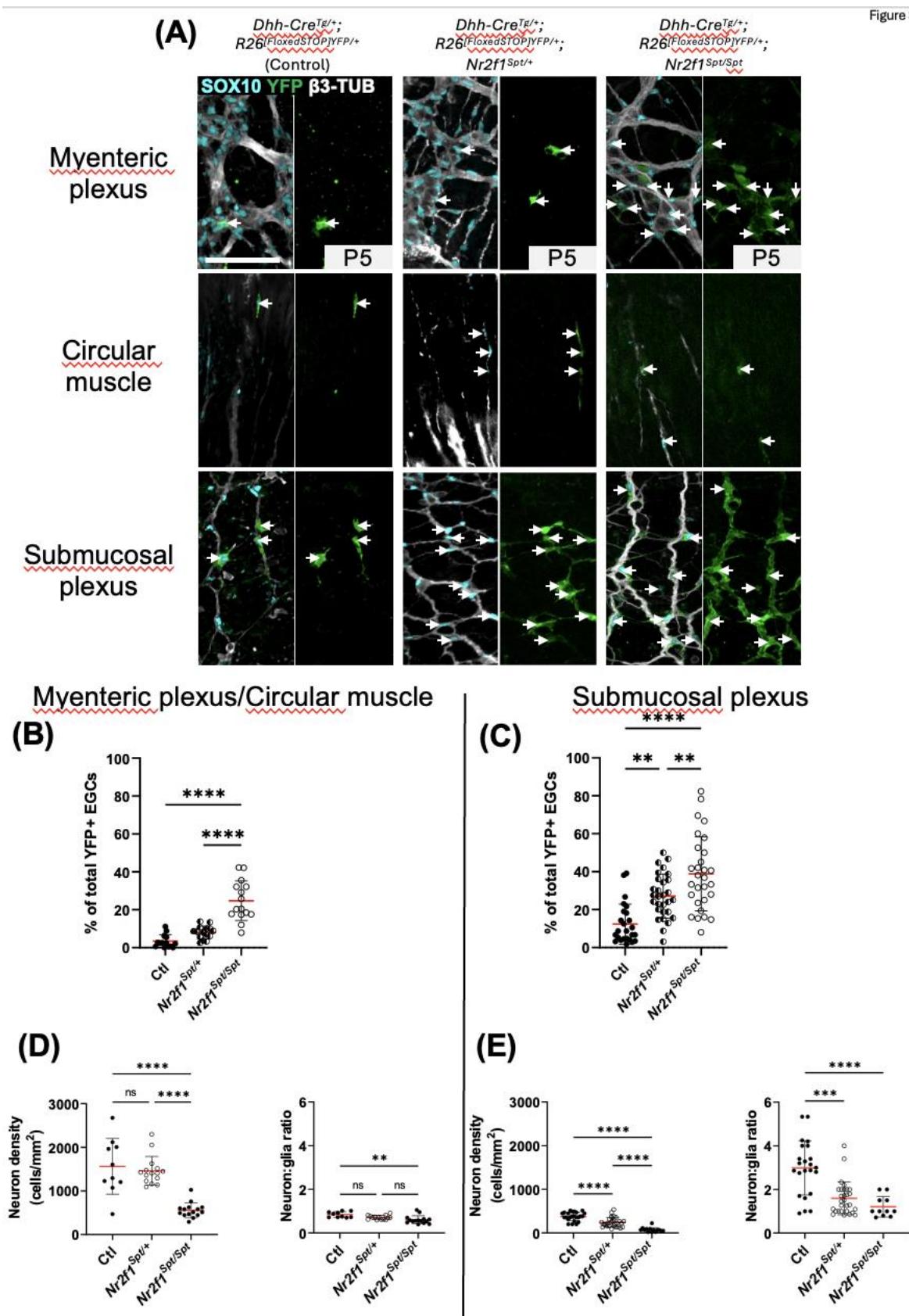


Figure S3. 5 Comparative analysis of the SCP contribution and neuronal density in the distal ileum from control, *Nr2f1*^{Spt/+} and *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice.

(A) Immunofluorescence analysis of the SCP contribution (YFP+) to the global pool of EGCs in the myenteric plexus / circular muscle layer and the submucosal plexus of the distal ileum from P5 control *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *R26*^{[FloxedSTOP]YFP/+} (Ctl), *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *R26*^{[FloxedSTOP]YFP/+}; *Nr2f1*^{Spt/+} and *Dhh-Cre*^{Tg/+}; *R26*^{[FloxedSTOP]YFP/+}; *Nr2f1*^{Spt/Spt} mice. Intestinal tissues were immunolabeled with antibodies against SOX10 for EGCs (cyan), GFP/YFP (green) and βIII-Tubulin for neuronal fibers (grey). Displayed images are z-stack projections representative of observations made from N=3 mice per time point. Scale bar, 70 μm. (B-C) Quantitative analysis of the SCP contribution to the global pool of EGCs (percentage of YFP+ SOX10+ EGCs among all SOX10+ EGCs) in the myenteric plexus/circular muscle layer (B) and the submucosal plexus (C). (D-E) Quantitative analysis of neuron density and neuron:glia ratio in the myenteric plexus/circular muscle layer (D) and the submucosal plexus (E) of the distal ileum from control (black dots), *Nr2f1*^{Spt/+} (half white half black dots), *Nr2f1*^{Spt/Spt} (white dots) mice (N=3 mice per time point; n=6-10 60x fields of view per animal). ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$; One-Way ANOVA and Šídák's multiple comparison test.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Une vision centrée sur les neurones a longtemps prédominé dans le champ de recherche du SNE, orientant la conception des travaux de recherche et des analyses de données expérimentales. Cependant, le nombre de publications indexées sous le terme “enteric glial cells” dans PubMed, a été multiplié par quatre au cours des vingt dernières années, et les présentations consacrées aux CGE se multiplient dans les congrès spécialisés. Ce regain d’intérêt témoigne d’un changement de paradigme : les CGE ne sont plus considérées comme de simples cellules de soutien, mais comme une population clé du SNE, dotée d’une diversité et de fonctions remarquables. C’est dans ce contexte que s’inscrivent les travaux présentés dans cette thèse.

Bien que la diversité gliale ait commencé à être décrite selon des critères morphologiques dans les années 1990 (Hanani et Reichenbach, 1994), les travaux de Boesmans et al. publiés en 2015, ont établi un cadre formel permettant de distinguer plusieurs sous-types gliaux chez la souris adulte (Boesmans *et al.*, 2015). Néanmoins, plusieurs questions demeuraient à la suite de ces travaux : à quel stade du développement se produit la diversification gliale ? Dans quel ordre apparaissent les sous-types, et cet ordre varie-t-il selon le segment intestinal ou l’axe séro-muqueux ? De plus, les PCS contribuent-ils à la gliogenèse entérique en condition physiologique, et participent-ils à la diversification gliale ?

Le premier article de cette thèse a précisément exploré ces questions. Dans cette étude, nous avons mis en évidence que, lors de la période postnatale, les sous-types topo-morphologiques émergent séquentiellement : I/II, puis III et IV dans le PM/muscle circulaire, tandis que dans le PSM, l’ordre observé est II, I et III. Ce modèle développemental suggère que la glie intra-réseau (Types I et II) apparaît d’abord, avant de devenir une source locale de la glie extra-réseau (Types III et IV) dans le PM, et de la glie intra- (Types I et II) et extra-réseau (Type III) du PSM. Par ailleurs, la génération de ces sous-types s’est révélée positivement corrélée aux variations morphométriques décrivant les changements structuraux des plexus et du muscle circulaire. Enfin, il a été démontré que les PCS contribuent à la gliogenèse, mais quantitativement de façon région-dépendante. Ces précurseurs ont la capacité de générer l’ensemble des sous-types topo-morphologiques mais de façon biaisée. Ils se différencient préférentiellement en type IV dans le PM/muscle circulaire et en type II dans le PSM. La génération des sous-types topo-morphologiques est ainsi influencée par des facteurs structuraux et la source de précurseur.

Ainsi, le premier article de cette thèse établit pour la première fois un référentiel détaillé et propose un modèle développemental de l'acquisition de la diversité topo-morphologique des CGE en conditions physiologiques, lors du développement postnatal. D'une part, cette étude fournit désormais un cadre permettant d'évaluer les altérations de la diversité gliale dans différents contextes pathologiques, tels que les neurocristopathies. D'autre part, elle constitue une référence pour mesurer l'efficacité des stratégies de régénération du SNE (thérapie cellulaire ou *in situ*), en servant de base pour apprécier la restauration de la diversité gliale. Enfin, ce travail démontre la contribution des PCS à la gliogenèse entérique en conditions saines et souligne l'importance de la pluralité des précurseurs cellulaires. La contribution différentielle des CCN et des PCS suggère que les approches thérapeutiques futures devront intégrer plusieurs sources de progéniteurs afin de reconstituer le SNE.

À ces travaux fait suite une seconde étude, réalisée cette fois-ci dans le contexte du modèle murin *Nr2fl^{Spt/Spt}*, du SW4. Le fait que la gliogenèse entérique embryonnaire soit perturbée dans ce modèle soulève la question des conséquences éventuelles sur la diversification gliale et la contribution des PCS dans les régions ganglionnaires. Les observations présentées dans cet article confirment le modèle développemental décrit précédemment, tout en mettant en évidence des altérations de la diversification et de la maturation morphologique du SNE. Par ailleurs, des mécanismes de compensation postnataux aux défauts développementaux ont également été observés, incluant une augmentation de la contribution des PCS, ainsi que la participation d'une population neuronale HU+ S100 β +

Les résultats de cet article complètent les rares études décrivant des altérations des segments ganglionnaires chez des modèles murins également rapportées chez l'humain affectés par le mégacôlon aganglionnaire (Bhave *et al.*, 2021; Bhave *et al.*, 2022; Cheng *et al.*, 2016; Musser *et al.*, 2015; Zaitoun *et al.*, 2013). Ces altérations ayant été principalement caractérisées chez les populations neuronales, il s'agit ici des premières évidences d'anomalies de la diversification gliale et de mécanismes de compensations dans une zone ganglionnaire, avant considérée comme normale. Ces observations s'inscrivent dans un contexte où la plupart des études se concentrent sur les régions aganglionnaires ou transitionnelles. Cependant, les déficits fonctionnels du GI à long terme, comme la constipation ou les maladies inflammatoires de l'intestin (Pakarinen et Mutanen, 2024), soulignent la nécessité de vérifier le statut physiologique des segments "sains" et d'identifier d'éventuelles altérations, afin d'adapter la prise en charge des patients et le développement de nouvelles solutions thérapeutiques.

4.1 Limites de la quantification des sous-types topo-morphologiques de CGE

Comme présenté dans la première partie de cette thèse, la classification topo-morphologique définit chez la souris adulte des sous-types gliaux selon leur localisation dans les plexus et les couches tissulaires, ainsi que selon leur morphologie (Boesmans *et al.*, 2015). Il s'agit de la seule classification actuellement disponible décrivant la diversité gliale selon ces critères, les marqueurs moléculaires ne permettant pas de distinguer des sous-types et la définition de sous-populations selon le profil transcriptionnel ne faisant pas encore consensus. Cependant, cette classification présente une portée limitée dans la littérature, avec un nombre limité de publications l'utilisant comme point de référence (Boesmans *et al.*, 2015; Rao *et al.*, 2015), tandis que d'autres études fonctionnelles se basent plutôt sur une distinction entre glie intraganglionnaire, extraganglionnaire ou mucosale (Baghdadi *et al.*, 2022; Seguella *et al.*, 2022).

Le choix d'utiliser cette classification comporte plusieurs désavantages. Premièrement, la quantification manuelle reste sujette à un certain degré de subjectivité de l'expérimentateur. Cela a nécessité l'établissement de règles de comptage strictes pour permettre la reproductibilité des résultats. De plus, l'utilisation d'un double immunomarquage SOX10 S100 β s'est avérée indispensable afin de lever le doute entre les types I et les types II aux bords connectifs des fibres interganglionnaires, en se basant sur leur morphologie (Figure S2.1). Ce marquage a également permis de valider que le comptage des cellules SOX10+ concernait majoritairement des CGE différencierées. Aux stades les plus précoce, le nombre de précurseurs uniquement positifs pour SOX10 est négligeable dans le PM, mais plus élevé dans le PSM, ce qui biaise plus fortement l'estimation absolue des CGE matures dans ce plexus. Enfin, des difficultés ont été rencontrées pour distinguer les types III du PSM, situés légèrement sous le plan du plexus, des types III de la muqueuse, localisés au niveau des cryptes et des villosités. Une rigueur particulière dans le découpage des différentes couches intestinales selon l'axe séro-muqueux est donc requise.

Deuxièmement, en raison de son caractère laborieux, la quantification manuelle limite le nombre de champs pouvant être analysés, pouvant créer un biais d'échantillonnage. Des vues en grossissement 20X (non publiées) ont néanmoins été capturées, et les images en 60X ont été acquises afin d'assurer une représentativité du tissu. Le développement d'un pipeline informatisé, par exemple basé sur l'utilisation de l'apprentissage profond, comme récemment appliqué à la quantification neuronale et ganglionnaire (Sorensen *et al.*, 2024), permettrait de standardiser rigoureusement les analyses et de réduire la subjectivité. Une telle approche accélérerait significativement l'analyse, permettrait d'augmenter la taille d'échantillonnage et la puissance statistique.

La classification topo-morphologique des CGE a été établie à une époque où la description de la diversité gliale restait encore très limitée. Néanmoins, les évidences s'accumulent concernant le fait qu'elle sous-estime l'hétérogénéité gliale. Dans le contexte des articles présentés dans cette thèse, cela souligne que l'étude de la diversification gliale n'en est encore qu'à ses prémices et semble bien plus complexe que ce qui en a été décrit. Des approches basées sur le scRNA-seq ont mis en évidence une hétérogénéité gliale beaucoup plus importante, reposant sur leur profil transcriptionnel (Baghdadi *et al.*, 2022; Drokhlyansky *et al.*, 2020; Guyer *et al.*, 2023; Lefevre *et al.*, 2023; Scavuzzo *et al.*, 2023 ; Schneider, S. K. *et al.*, 2023; Zeisel *et al.*, 2018). Parallèlement, une étude récente, dans laquelle ont été réalisées des cultures primaires de CGE à partir du PM/muscle lisse de souris adultes, a permis d'identifier deux nouveaux types morphologiques gliaux, avec des formes dites en "triade" ou "bipolaire" (ce dernier type étant distinct des types IV bipolaires/fibreux intramusculaires) (Scavuzzo *et al.*, 2023) (Figure 4.1). Cependant, il convient de faire preuve de prudence quant à leur signification biologique, car ces observations pourraient résulter d'artefacts liés à l'isolement cellulaire ou aux conditions de culture *in vitro*.

Enfin, certaines subdivisions topologiques fines n'ont pas été prises en compte dans la classification topo-morphologique. Des résultats préliminaires du laboratoire Pilon montrent notamment que les Types III situés dans la muqueuse peuvent être observés dans deux localisations distinctes : les cryptes et les villosités. Malgré leur positionnement dans la même couche tissulaire, ces structures ont des fonctions et des microenvironnements différents dans la physiologie du tractus gastrointestinal (Figure 4.1). L'analyse de la muqueuse en tenant compte de cette distinction — écartée pour des raisons techniques dans les travaux présentés dans cette thèse mais validée par d'autres équipes de recherche — aurait permis une compréhension plus fine de la diversification gliale. Elle aurait notamment apporté des éléments de réponse aux questions suivantes : quelle est la temporalité d'apparition des types III mucosaux ? Quelle est la séquence d'apparition des cellules gliales des cryptes par rapport à celles des villosités ? Une telle subdivision aurait ainsi permis d'obtenir une vision plus complète du modèle développemental des sous-types topo-morphologiques.

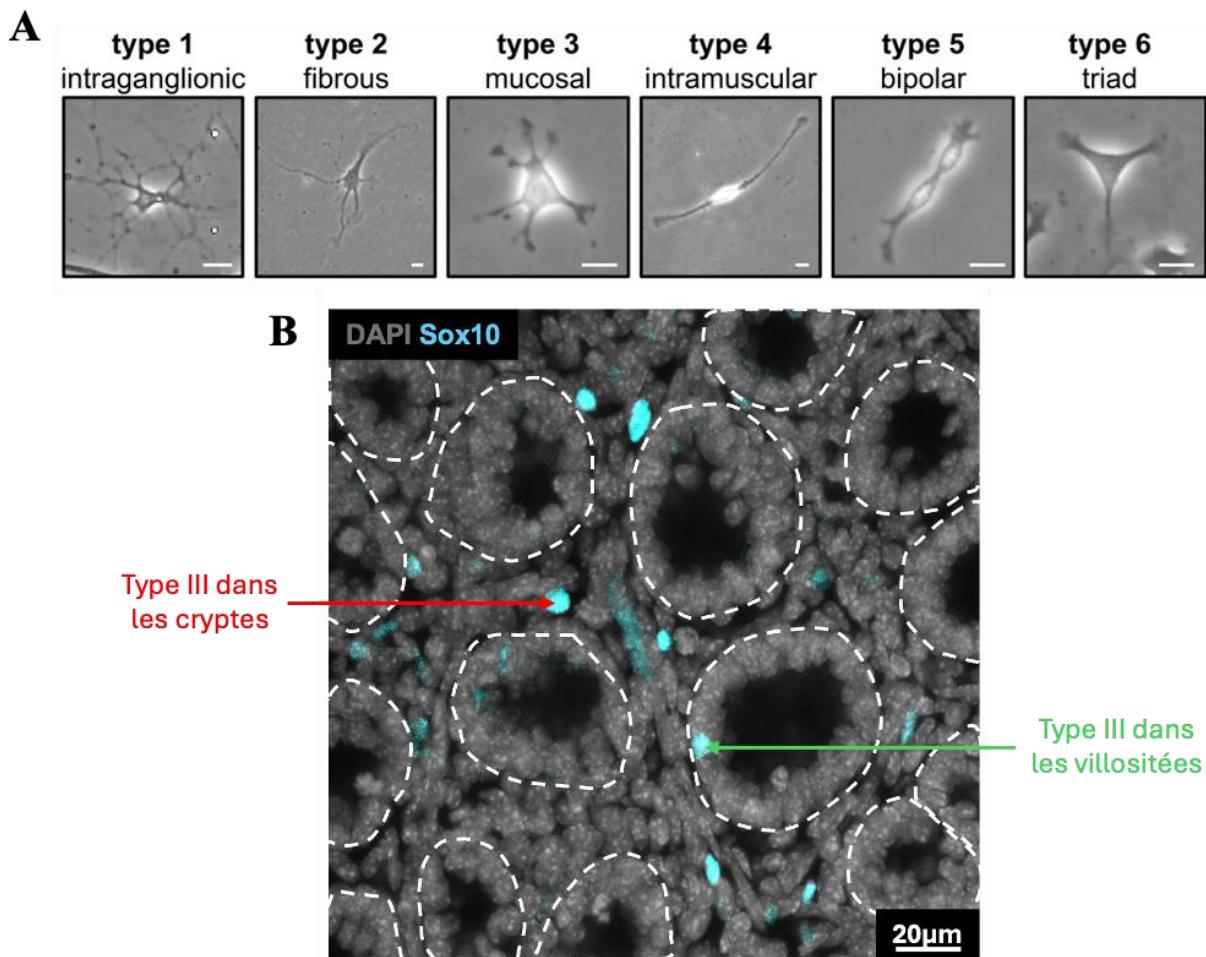


Figure 4.1 : Sous-types gliaux morphologiques et topo-morphologiques additionnels

(A) Images représentatives de cultures cellulaires primaires de CGE à partir d'intestins adultes de souris. Six types morphologiques de CGE sont décrits, dont les types 5 et 6, respectivement dits "bipolaire" et "triade". Barre d'échelle : 20 μ m. Adapté de (Scavuzzo *et al.*, 2023) (B) Images représentatives de la muqueuse à P5, grossissement 60X, montrant des CGE de types III mucosaux exprimant SOX10 (en bleu) situés dans les cryptes (flèche rouge) et dans les villosités (flèche verte). La morphologie de la muqueuse est observable via l'organisation des noyaux cellulaires DAPI+ (en gris). Barre d'échelle : 20 μ m. Données préliminaires du laboratoire du Pr Pilon.

4.2 De l'intérêt d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires

Actuellement, un nombre limité de marqueurs moléculaires permettent d'identifier les CGE. Leur expression commune avec les CCN, les CCNE et les PCS, ainsi que le fait qu'ils ne suffisent pas à décrire des sous populations gliales, souligne la nécessité d'identifier de nouveaux marqueurs moléculaires. Cela permettrait de mieux appréhender la diversité phénotypique gliale, leur développement, leurs fonctions et leurs rôles physiopathologiques. Les analyses de scRNA-seq offrent une opportunité unique de découvrir de nouveaux marqueurs délimitant des sous-populations gliales (Baghdadi *et al.*, 2022; Droklyansky *et al.*, 2020; Guyer *et al.*, 2023; Lefevre *et al.*, 2023; Scavuzzo *et al.*, 2023 ; Schneider, S. K. *et al.*, 2023; Zeisel *et al.*, 2018). Cependant, aucun consensus n'existe à ce jour concernant ces sous-populations transcriptionnelles. Les études utilisant cette technique se multiplient, mais elles reposent sur des stratégies expérimentales très hétérogènes, différant selon l'âge et le stade développemental étudiés, l'espèce et le modèle transgénique, la méthode d'isolation des CGE, la plateforme de séquençage et les modalités d'analyse (Baghdadi *et al.*, 2022; Droklyansky *et al.*, 2020; Fawkner-Corbett *et al.*, 2021; Guyer *et al.*, 2023; Scavuzzo *et al.*, 2023; Schneider, S. K. *et al.*, 2023; Wright *et al.*, 2021; Zeisel *et al.*, 2018).

Ainsi, pour approfondir l'étude de la diversité gliale, une des suites possibles de cette thèse serait de réanalyser des données de scRNA-seq, comme cela a été effectué dans d'autres domaines de recherche à travers des approches dites multimodales. Cela permettrait ainsi de définir des marqueurs moléculaires candidats (Butler *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2021; Stuart *et al.*, 2019). Chaque marqueur candidat devrait ensuite être évalué afin de déterminer : son expression protéique par les sous-types topo-morphologiques (par immunofluorescence), la fonction physiologique de la population qui l'exprime (via l'évaluation de l'impact d'une ablation de cette population par des tests fonctionnels). De même, il pourrait être déterminé si cette sous-population est affectée dans des contextes pathologiques pertinents en la comparant entre un contrôle sain et une condition malade. Par exemple, si le marqueur délimite spécifiquement une population de CGE uniquement localisée dans la muqueuse, il serait pertinent de l'étudier dans un modèle murin de maladie inflammatoire de l'intestin, tel que la maladie de Crohn, dans laquelle la perméabilité intestinale est affectée.

Pour donner une idée de comment évaluer un marqueur candidat et ainsi à titre d'exemple : sans procéder à une réanalyse globale, mais en croisant plusieurs études de scRNA-seq sur les CGE, le laboratoire du Pr Pilon a identifié SLC18A2 comme marqueur potentiel d'une sous-population gliale (Droklyansky *et al.*, 2020; Zeisel *et al.*, 2018). L'évaluation de la distribution de son expression protéique parmi les sous-types

topo-morphologiques a révélé qu'il n'était pas exprimé par les types IV dans le PM/muscle circulaire, mais exclusivement par les types III dans le PSM. De plus, 100% des types III situés dans les villosités étaient positifs pour ce marqueur (Figure 4.2). Ces résultats suggèrent que SLC18A2 délimite une nouvelle population gliale dont la signification biologique reste à déterminer. Afin d'évaluer les fonctions des CGE SLC18A2+, elles seront déletées dans un modèle murin *Slc18a2-Cre;Rosa26-DTA* (Toxine diptérique A - Diphteria Toxin A). L'impact fonctionnel de cette ablation sera déterminé à différents niveaux : la motilité intestinale (test d'expulsion de la bille), la perméabilité (chambre de Ussing, FITC-Dextran), le microbiote (séquençage 16S) et le système immunitaire (profil immunitaire par cytométrie en flux). À l'avenir, AJAP1 (protéine 1 associée aux jonctions d'adhérence - adherens junctions associated protein 1) également retrouvé dans plusieurs analyses par scRNA-seq sera également étudiée.

Pour conclure cette section, définir de nouvelles populations gliales nécessite un consensus de la communauté scientifique concernant la délimitation de ces populations. Dans le domaine de recherche des neurones, du fait de l'augmentation importante de l'utilisation de technologies de séquençage avancées pour étudier les populations neuronales, Majd et al ont récemment lancé un appel afin d'uniformiser l'annotation des populations transcriptionnelles et ainsi d'améliorer la compréhension de l'identité neuronale. Cet appel souligne également l'importance d'employer des techniques avancées pour appréhender leur contexte fonctionnel (dont l'imagerie multiplexée, l'électrophysiologie, la transcriptomique spatialisée, ou encore le profilage de l'épigénome, du protéome et du métabolome) (Majd *et al.*, 2024). Il est très probable qu'un appel similaire soit initié à l'avenir concernant les CGE.

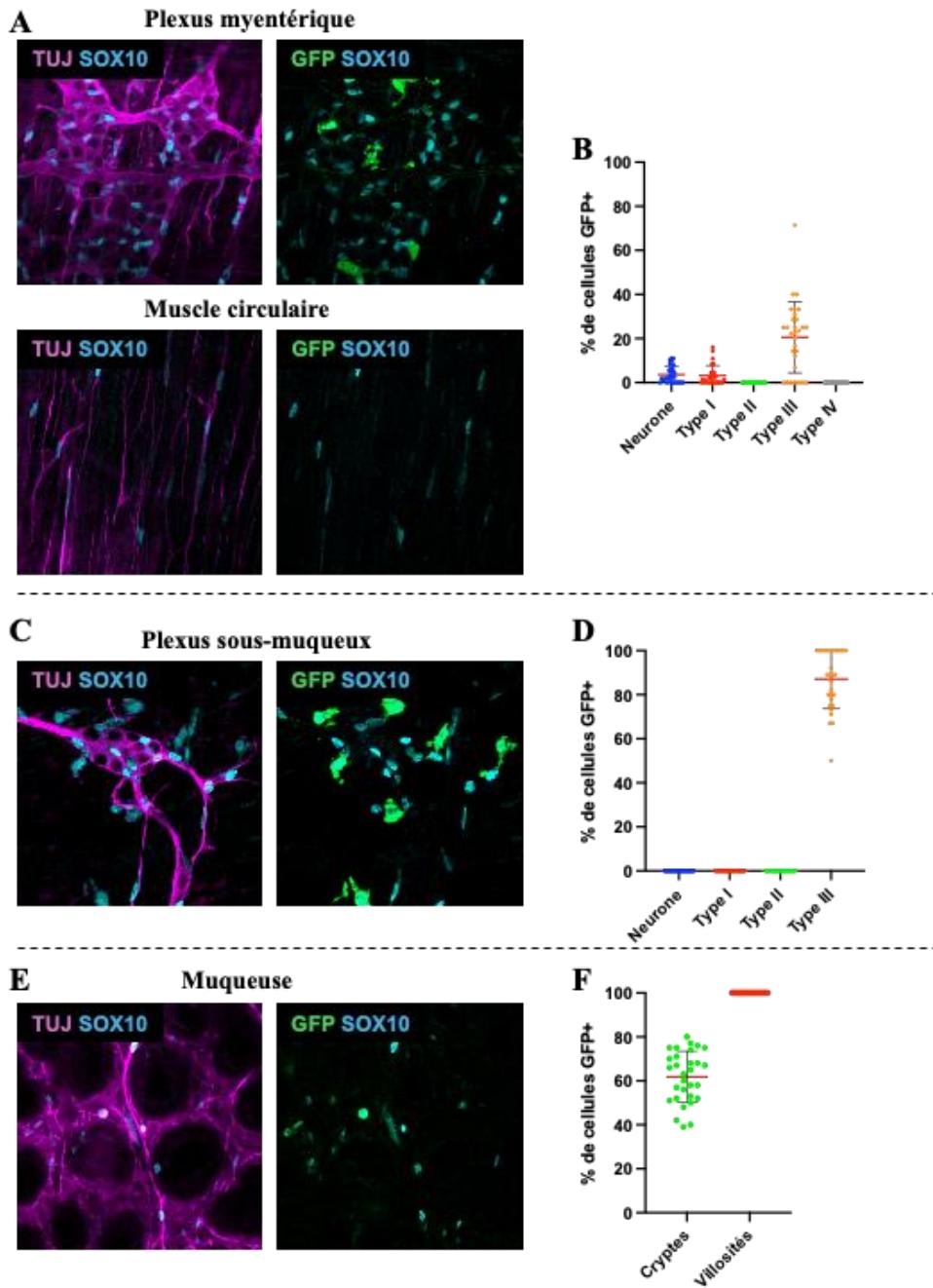


Figure 4.2 : Quantification de la population de CGE GFP⁺

(A, C, E) Images représentatives de l'expression de GFP⁺ par les CGE dans le plexus myentérique, le muscle circulaire (A), le plexus sous-muqueux (C) et la muqueuse (E), dans le côlon distal de souris *Slc18A2-Cre^{+/−};Rosa26-YFP^{+/−}*. (B, D, F) Quantification des proportions des sous-types topomorphologiques GFP⁺ dans le plexus myentérique/muscle circulaire (B), le plexus sous-muqueux (D) et la muqueuse (F).

4.3 Étudier la diversification gliale par scRNA-seq

Le premier article de cette thèse a permis de proposer un modèle théorique décrivant la séquence de diversification des sous-types topo-morphologiques (Lefèvre *et al.*, 2024). Dans la lignée murine $Nr2f1^{Spt/Spt}$, on observe les conséquences postnatales de la gliogenèse embryonnaire prématurée. Ces observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle les types I et II (glie intra-réseau) constituent les sources locales des autres sous-types (glie extra-réseau). Cependant, avec les outils actuels il est difficile de confirmer ce modèle théorique. En effet, en l'absence de marqueurs moléculaires permettant de distinguer clairement les populations topo-morphologiques, les outils d'étude de lignage cellulaire (souris transgéniques Cre-lox) ne peuvent pas être employés pour tester directement ce modèle hiérarchique.

Il serait pertinent d'explorer les réseaux de régulation génétique impliqués dans la diversification gliale, susceptibles d'être perturbés par la surexpression embryonnaire de $Nr2f1$. Des cellules NCAM+, marqueur exprimé par les PCS, les CGE et quelques neurones (Gary *et al.*, 2025; Keirstead *et al.*, 1999), pourraient être isolées par tri cellulaire, à partir d'échantillons intestinaux de souris WT et $Nr2f1^{Spt/Spt}$. Puis des analyses de scRNA-seq seraient ensuite réalisées aux stades postnataux clés identifiés dans les travaux précédents : entre P1 et P5, période correspondant à l'émergence des sous-types et à leur expansion jusqu'à P15. Le temps P20, en revanche, serait trop tardif compte tenu de la faible survie des animaux mutants.

À partir de ce séquençage, des outils bio-informatiques permettront d'analyser l'évolution des sous-populations transcriptionnelles au cours du développement postnatal (par exemple, l'apparition, la disparition et/ou l'expansion), d'identifier leurs perturbations éventuelles chez les $Nr2f1^{Spt/Spt}$ et de réaliser des inférences de trajectoires développementales "pseudo-time" avec des outils comme Monocle (Trapnell *et al.*, 2014). Ce dernier permet également d'examiner la dynamique d'expression génétique au cours du temps, et de repérer les gènes aux points d'embranchement des lignages cellulaires. Cela a pour objectif de déterminer des réseaux de régulation décisionnels dans le destin cellulaire (Laddach *et al.*, 2023). Les régulateurs candidats devront ensuite être validés par génération de modèles murins knock-out et leur caractérisation phénotypique, afin de préciser leur rôle dans le développement glial. Malgré les avancées récentes pour reconstituer *in vitro* le SNE et la paroi intestinale, notamment avec la technologie des organoïdes (Mahe *et al.*, 2017), l'étude de la diversification gliale reste à ce jour uniquement accessible *in vivo*, ce qui complique l'identification de nouveaux régulateurs.

Cette expérience permettrait également de suivre la trajectoire développementale des PCS et de tester plusieurs hypothèses. Selon la source de progéniteurs, les CGE dérivées pourraient présenter des profils transcriptionnels distincts, notamment par le maintien de l'expression de gènes caractéristiques des PCS

(par exemple Mpz, dont l'expression protéique n'a pas pu être détectée) (Lefèvre *et al.*, 2024). De plus, une augmentation de la taille de la population de PCS pourrait être observée dans le contexte pathologique, reflétant les observations *in vivo*. Enfin, l'hypothèse d'une éventuelle modification du profil transcriptionnel des PCS chez les *Nr2f1^{Spt/Spt}* pourrait être testée, et qui s'alignerait avec la modification de leur contribution.

Le choix du marqueur NCAM pour isoler les cellules permet d'inclure les neurones dans l'analyse et d'étudier la neurogenèse dérivée des CGE par inférence de trajectoires développementales. Cette approche pourrait révéler l'existence d'une population gliale neurogénique (ou confirmer une population déjà décrite dans la littérature) (Boesmans *et al.*, 2022; Guyer *et al.*, 2023; Lefevre *et al.*, 2023). Plus spécifiquement, cette expérience permettrait d'analyser le profil transcriptionnel de la population neuronale co-exprimant HuC/D et S100 β . Il serait ensuite pertinent de comparer ce profil à celui des autres populations neuronales afin de mieux définir leur identité et de déterminer si cette population dérive exclusivement des CGE, ce qui pourrait expliquer l'expression persistante de S100 β .

À partir des échantillons contrôles, il serait également possible d'identifier des marqueurs moléculaires candidats des sous-populations transcriptionnelles apparaissant au cours du développement postnatal. Ces marqueurs devront ensuite être validés par immunofluorescence. Cependant, il n'existe aucune certitude quant à une correspondance directe entre profil transcriptionnel et sous-type topo-morphologique. Il est probable qu'une combinaison de marqueurs moléculaires, plutôt qu'un seul, soit nécessaire pour identifier précisément ces sous-types. Enfin, cette approche permettrait aussi d'évaluer si la diversité transcriptionnelle et moléculaire des CGE est altérée chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*.

En conclusion, la réalisation d'un scRNA-seq au cours du développement postnatal fournirait des connaissances fondamentales sur la diversité transcriptionnelle et moléculaire gliale. Elle permettrait également d'identifier les réseaux de régulation génétique impliqués dans leur diversification, ainsi que les perturbations de cette diversité dans le contexte du mégacôlon aganglionnaire.

4.4 Diversification gliale et changements structuraux tissulaires

Dans les deux études présentées dans cette thèse, la diversification gliale a été évaluée parallèlement aux modifications structurales des plexus et de la couche musculaire circulaire. L'évolution des proportions des sous-types topo-morphologiques au cours de la période postnatale s'est révélée corrélée positivement aux variations des paramètres morphométriques des tissus intestinaux, indépendamment du segment étudié. Chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*, cette corrélation reste positive, mais le coefficient de Pearson est fortement

diminué dans le PM et le muscle circulaire, alors qu'il demeure similaire dans le PSM. Cette différence entre les deux plexus reste toutefois inexpliquée.

À ce jour, le lien entre diversification gliale et maturation morphologique du tissu demeure largement méconnu. Les sections précédentes ont porté sur les facteurs intrinsèques de la diversité gliale, mais il est très probable que l'acquisition des sous-types topo-morphologiques soit également régulée par des composantes cellulaires et non cellulaires du microenvironnement tissulaire, comme cela est décrit pour la gangliogenèse et la gliogenèse entérique (présentées dans le premier chapitre).

À titre d'exemple, l'un des facteurs extrinsèques cruciaux dans le développement du SNE est la composition de la matrice extracellulaire. Dans un modèle murin d'HSCR développé dans le laboratoire du Pr Pilon, la lignée *Holstein*, l'augmentation du niveau protéique de collagène VI dans la matrice entraîne une altération de la colonisation et résulte en la formation d'un mégacôlon aganglionnaire (Soret *et al.*, 2015). D'autres composants, comme la laminine-1, promeuvent également la migration des CCNE dans l'intestin (Nakazawa *et al.*, 2013). In vitro, la présence de différents composants matriciels module directement le destin cellulaire neuronal ou glial, ainsi que leur différenciation (Raghavan *et al.*, 2013). Plus spécifiquement pour les CGE, une étude récente a démontré in vitro que la composition de la matrice influence : leur capacité à s'organiser en réseaux, leur profil transcriptionnel, leur état prolifératif et de différenciation (Schneider *et al.*, 2024).

Le collagène IV, la laminine et la fibronectine sont les composants principaux qui forment la membrane basale des ganglions entériques et sont principalement produits par les fibroblastes et les cellules musculaires (Bannerman *et al.*, 1986; Nakazawa *et al.*, 2013; Schneider *et al.*, 2024). Une caractérisation fine de la distribution locale et de leur évolution postnatale par microscopie confocale pourrait fournir des pistes sur le microenvironnement impliqué dans l'organisation structurelle du SNE. Il serait pertinent d'évaluer la diversification gliale en induisant, au cours du développement, une délétion gliale des gènes codant pour les récepteurs d'adhésion à ces composants (intégrines, récepteurs DDR). Une telle approche permettrait d'établir un lien de causalité fonctionnel entre diversification gliale et matrice extracellulaire. Enfin, dans la lignée *Nr2f1^{Spt/Spt}*, l'analyse des effets de la surexpression de *Nr2f1* sur les interactions CGE/matrice extracellulaire pourrait aider à élucider l'un des mécanismes sous-jacents aux altérations structurelles observées et expliquer la diminution du lien de corrélation entre paramètres morphométriques et proportions de CGE.

L'étude de la matrice extracellulaire ne représente qu'un point de départ pour comprendre les facteurs extrinsèques impliqués dans la diversification gliale et l'organisation structurelle du tissu. Au même titre, il serait nécessaire d'étudier, par exemple, les interactions cellule-cellule (entre CGE et neurones, CGE et macrophages muscularis), ainsi que le rôle des morphogènes sécrétés par le mésenchyme intestinal et l'épithélium.

Un certain nombre de questions demeurent en suspens. Quelles sont les voies moléculaires responsables de la mise en place structurelle des plexus ? Pourquoi le PM et le PSM adoptent-ils des architectures différentes ? Quels sont les mécanismes qui coordonnent la diversification gliale avec la maturation morphologique des tissus et des plexus ? Pourquoi observe-t-on une diminution de la corrélation entre proportions des sous-types topo-morphologiques et paramètres morphométriques principalement dans le PM, mais pas dans le PSM, des souris *Nr2f1^{Spt/Spt}* ? Enfin, quel rôle joue le microenvironnement cellulaire (les neurones par exemple) et non-cellulaire dans la diversification et la mise en place du réseau glial ?

4.5 Étudier la diversité gliale dans le contexte des thérapies régénératives du SNE

La description de la diversité gliale en condition normale a permis d'établir un référentiel utile pour comparer ses altérations dans divers contextes pathologiques, mais aussi dans le cadre de la recherche et du développement de nouvelles approches thérapeutiques. Dans l'objectif de proposer aux patients HSCR une alternative à la chirurgie et à ses effets secondaires post-opératoires, deux stratégies thérapeutiques principales sont en cours de développement : la transplantation cellulaire et la régénération du SNE *in situ*.

La transplantation cellulaire repose sur l'isolation de progéniteurs issus de différentes sources, telles que les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) dérivées de fibroblastes de patients, les cellules souches embryonnaires, les CCNE isolées de biopsies intestinales ou encore les organoïdes. Ces progéniteurs peuvent, si nécessaire, être corrigés génétiquement avant injection dans le segment aganglionnaire. Toutefois, cette stratégie soulève encore plusieurs défis majeurs : la sécurité pour le patient, notamment en raison du risque de tumorigénèse post-implantation ; l'incapacité à corriger d'éventuelles altérations génétiques non identifiées lors de la phase de thérapie génique ; l'efficacité limitée de la greffe ; ainsi que les difficultés liées à la méthode d'administration des cellules (Alhawaj, 2022).

Quant à la stratégie de régénération *in situ* du SNE, elle ne présente pas les mêmes limitations, et constitue une approche moins invasive que la thérapie cellulaire. Elle repose sur l'administrations de lavements rectaux de GDNF chez la souris nouveau-née, stimulant les progéniteurs résidents du tissu. Soret et al. ont démontré l'efficacité de cette thérapie sur la survie de modèles murins d'HSCR, et sa capacité à régénérer

le SNE dans les parties aganglionnaire murin, grâce notamment à la contribution des PCS. Cette approche a également permis d'induire une neurogenèse dans des explants intestinaux humains (Soret *et al.*, 2020). Dans la continuité de ces travaux, Gary *et al.* ont montré que NCAM1 participe au mécanisme d'action du GDNF. Cette découverte suggère que cette thérapie pourrait être applicable même chez les patients atteints d'HSCR porteurs de mutations du gène RET — les variants de RET représentant les mutations les plus fréquentes dans les HSCR à segment court. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence l'existence d'une troisième source de progéniteurs, distincte des CCN et des PCS (Gary *et al.*, 2025).

Lors de l'évaluation de l'efficacité de ces thérapies, l'attention est portée presque exclusivement sur la composante neuronale du SNE. La neurogenèse et la reconstitution de la diversité neuronale sont évalués, de même que la génération de nouvelles CGE SOX10+, mais il reste inconnu si ces thérapies permettent de restaurer la diversité gliale normale. Le premier article de cette thèse apporte une référence essentielle en caractérisant la diversité topo-morphologique gliale au cours de la période postnatale, dans l'iléon et le côlon distal. Ce travail constitue donc une base pour évaluer la capacité des thérapies régénératives à rétablir cette diversité. Dans la continuité de cette thèse et des recherches du laboratoire du Pr Pilon sur le GDNF, il pourrait être pertinent de quantifier la proportion des sous-types topo-morphologiques dans les colons traités au GDNF et de les comparer aux contrôles WT. Cette analyse est d'autant plus importante que le traitement au GDNF augmente la contribution des PCS, dont la différenciation biaisée vers certains sous-types pourrait altérer la diversité gliale. Bien évidemment, des avancées sur l'étude de la diversité gliale (identification de sous-populations, de marqueurs moléculaires) seront nécessaires pour véritablement évaluer la régénération gliale.

4.6 Contribution des PCS dans la diversification gliale

4.6.1 Dans un contexte physiologique

Comme indiqué dans l'introduction, Uesaka *et al.* ont déterminé que les PCS contribuaient à la neurogenèse entérique durant la période postnatale en condition saine et dans des modèles murins de HSCR (Uesaka *et al.*, 2015; Uesaka *et al.*, 2021). Le premier article de cette thèse fait suite à ces travaux et apporte des informations complémentaires en caractérisant la contribution des PCS dans la diversification gliale. Comme pour la neurogenèse, cette contribution se fait de façon plus marquée dans le côlon, ce qui pourrait être expliqué notamment par une innervation extrinsèque plus importante de ce segment intestinal (Niu *et al.*, 2020). Cela suggère que le recrutement des PCS est influencé par des facteurs spatiaux et que leur migration est limitée localement. Quels sont les signaux normalement responsables de ce recrutement et de leur différenciation en sous-types topo-morphologiques gliaux ou en neurones ? Cela est encore à explorer.

Ces PCS contribuent de façon biaisée à la diversification gliale, se différenciant préférentiellement en types I/IV et II respectivement dans le PM/muscle circulaire et le PSM, et participent ainsi à la diversité gliale de façon spécifique. Ces évidences qui montrent que différentes sources de précurseurs du SNE ne présentent pas le même potentiel de différenciation, devraient être prises en compte dans le cadre des thérapies régénératives basées sur l'implantation de précurseurs (Alhawaj, 2022). A titre d'exemple, il pourrait être intéressant de combiner différentes sources comme des NCC autologues isolées de segments intestinaux de patients associées à des PCS isolés de nerfs périphériques. Il est d'autant plus important d'inclure ces précurseurs qu'ils présentent un potentiel régénératif qui est exploité dans la thérapie générative *in situ* basée sur l'utilisation du GDNF (Soret *et al.*, 2020).

4.6.2 Dans un contexte pathologique

La contribution des PCS au développement du SNE a également été étudiée dans des modèles murins de HSCR haploinsuffisants pour *Sox10* (*Sox10*^{Venus/+}/*Dhh* :: *Cre/Ret*^{flox}-*mCherry*) et *Ednrb*^{-/-}. Les neurones dérivés des PCS se sont révélés abondants dans la zone de transition, caractérisée par une hypoganglionose, mais plus rares dans les zones aganglionnaire et ganglionnaire. Ces résultats suggèrent que la neurogenèse dérivée des PCS est inversement corrélée à la densité neuronale, une forte densité neuronale diminuant cette contribution (Uesaka *et al.*, 2021). Dans le modèle *Nr2f1*^{Spt/Spt}, nous avons observé une augmentation de la contribution des PCS à la gliogenèse entérique dans l'iléon distal ganglionnaire. Cela a soulevé la question du statut de la densité neuronale. Effectivement, la contribution des PCS aux CGE s'est avérée inversement proportionnelle à cette densité. Ce phénomène est particulièrement marqué chez les *Nr2f1*^{Spt/+}, qui présentent une diminution de la densité neuronale dans le PSM (où la contribution des PCS est augmentée), mais pas dans le PM (où cette contribution reste normale). Ainsi, les PCS peuvent compenser partiellement, au cours de la période postnatale, le déficit de colonisation des CCN initié pendant le développement embryonnaire. Toutefois, ce mécanisme compensatoire ne suffit pas à rétablir une densité neuronale et gliale normale, qui demeure significativement réduite dans le PM et le PSM des *Nr2f1*^{Spt/Spt}.

Les PCS peuvent être considérés comme une niche de précurseurs « CCN-like » associés aux nerfs, qui persiste plus tardivement après la naissance. La variation de leur contribution en fonction de la densité neuronale suggère qu'il s'agit d'une population dotée d'une grande plasticité. Ils sont ainsi comparables à la glie radiale du SNC, capable de générer des neurones, des oligodendrocytes et des astrocytes (Jessen et Mirsky, 2019; Malatesta et Götz, 2013). Leur contribution ne se limite pas au SNE : ils peuvent également former des neurones dans les ganglions parasympathiques (Dyachuk *et al.*, 2014). En revanche, la signalisation qui contrôle leur recrutement dans l'intestin reste méconnue. Quelques évidences existent toutefois dans le SNP. *In vivo* (chez le zebrafish et la souris) et *in vitro*, la protéine de surface NRG1 de

type III, exprimée par les axones neuronaux, stimule la migration des PCS via le récepteur ErbB et induit leur activité migratoire (Miyamoto *et al.*, 2017; Perlin *et al.*, 2011). Il serait intéressant de déterminer si cette voie de signalisation est également impliquée dans le SNE.

4.7 Anomalies phénotypiques des zones ganglionnaires dans le contexte d'HSCR

Par définition, le phénotype du SNE chez les patients HSCR se divise en trois régions : une zone normale, une zone aganglionnaire et une zone de transition. Cette dernière est caractérisée par une aganglionose partielle, une hypoganglionose myentérique et une hypertrophie des nerfs extrinsèques (Yang *et al.*, 2022). Chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*, l'aganglionose se limite au côlon et place la zone de transition hypoganglionnaire dans le côlon proximal (Bergeron *et al.*, 2016). Cependant, dans l'iléon distal, plusieurs observations issues du deuxième article de cette thèse — augmentation de la contribution des PCS, diminution de la densité neuronale et gliale, baisse du ratio neurone/glie, augmentation de la taille du corps cellulaire neuronal — soulèvent la question du statut physiologique de cette zone ganglionnaire.

Dans les zones ganglionnaires des modèles murins d'HSCR, des altérations du SNE ont été déjà décrites, pouvant expliquer les symptômes de dysmotilités intestinales ou d'altérations fonctionnelles du GI à long terme chez les patients HSCR, malgré la résection chirurgicale. Ces altérations incluent : une diminution du nombre de ganglions et de la densité des fibres neuronales associée à un ralentissement du transit (Bhave *et al.*, 2021), un débordement allant jusqu'à la surreprésentation de certains neurones, comme les nitrergiques (Cheng *et al.*, 2016; Roberts *et al.*, 2008; Touré *et al.*, 2019; Zaitoun *et al.*, 2013) ou encore la disparition de populations neuronales spécifiques (Bhave *et al.*, 2022). D'autres résultats montrent une modification de la densité neuronale, une altération du ratio neurone/glie et une perturbation des proportions respectives de ces cellules (Musser *et al.*, 2015). Cela suggère qu'il serait intéressant de réaliser des analyses complémentaires chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*. Celles-ci pourraient inclure : la quantification par immunofluorescence des proportions des différents sous-types neuronaux (cholinergiques, nitrergiques, peptidergiques), l'évaluation de la motilité intestinale *ex vivo* par cartographie spatiotemporelle des mouvements intestinaux (qui évalue la motilité par capture vidéo d'un intestin placé en chambre d'organe) (Kendig *et al.*, 2016), et l'étude de la perméabilité intestinale à l'aide d'une chambre de Ussing.

Une altération inattendue observée dans la zone ganglionnaire étudiée est l'apparition de neurones HuC/D+ S100 β +, qui semble constituer un second mécanisme compensatoire à l'altération de la colonisation par les CCN. Ces neurones, décrits précédemment dans le duodénum et le côlon de souris juvéniles (Grundmann *et al.*, 2016; Parathan *et al.*, 2020), n'étaient toutefois pas présents dans le PM de l'iléon distal avant P15 (bien qu'ils soient observés dans le PSM à ce stade). En revanche, chez les souris *Nr2f1^{Spt/Spt}*, ils sont déjà

abondants dès P5 dans le PM et le PSM. Bien que décrite depuis une dizaine d'années, cette population reste encore mal caractérisée. Plusieurs approches pourraient être envisagées : déterminer par immunofluorescence à quelle sous-population appartiennent ces neurones HuC/D+ S100 β + ; analyser leur activité par neuroimagerie fonctionnelle, en mesurant le potentiel d'action au moyen de marqueurs dépendants du voltage et après stimulation par un composé neuroactif (Elfers *et al.*, 2025); ou encore réaliser des observations en imagerie calcique afin de cartographier les réseaux activés par ces neurones (Hazart *et al.*, 2025).

4.8 Rôle de Nr2f1 dans la diversification gliale et la contribution des PCS

NR2F1 est impliqué dans le développement de cellules gliales myélinisantes, incluant les oligodendrocytes du SNC et les cellules du Schwann du SNP (Bonnamour *et al.*, 2022; Lopez-Anido *et al.*, 2015). Bergeron et al. ont démontré que sa dérégulation perturbe la gliogenèse entérique et entraîne la surexpression des gènes gliaux (comme *Fabp7*, *Mpz*, *S100 β*) dans les CCNE à E12.5 chez la lignée murine *Nr2f1^{Spt/Spt}* (Bergeron *et al.*, 2016). Dans cette thèse, il a été montré que le déficit de colonisation des CCN induit par la surexpression de *Nr2f1* lors du développement embryonnaire, induit également des anomalies postnatales du SNE, dont de la diversification gliale dans une zone ganglionnaire. Cependant, le mécanisme exact par lequel NR2F1 régule l'acquisition du destin glial reste inconnu. Son rôle éventuel dans la spécification des sous-types topo-morphologiques demeure également à déterminer. De plus, il est tout à fait méconnu si les observations réalisées lors de la période postnatale sont dues au maintien ou non de la surexpression de *Nr2f1* dans les cellules dérivées des CCN. Une analyse de l'expression protéique de ce gène dans les CGE par immunofluorescence à des âges postnataux, pourrait nous en apprendre plus sur l'importance de ce gène dans la diversification gliale.

Un projet du laboratoire du Pr Pilon a été dédié à l'exploration du rôle de NR2F1 dans la régulation du destin cellulaire des CCN. Cela a notamment permis de caractériser une co-expression de NR2F1 et SOX10 pendant les premières étapes de migration et spécification des CCN dans les embryons WT. Toutefois, l'expression faible et ubiquitaire de NR2F1 dans les cellules intestinales dès E11.5 ne permettait pas de conclure sur son rôle dans le développement du SNE en condition physiologique. Chez les embryons *Nr2f1^{Spt/Spt}*, *Nr2f1* est surexprimé dans les CCN SOX10+ avant la colonisation du GI. De plus, des essais luciférases, RT-qPCR et BiFC ont démontré que NR2F1 interagit directement avec SOX10 pour moduler l'activité transcriptionnelle des gènes gliaux ciblés par SOX10. Dans ce projet, le transcriptome de CCN isolées à E10.5 (lignées *Gata4-pRFP* et *Gata4-pRFP;Nr2f1^{Spt/Spt}*, GATA4 étant un marqueur de CCN) a été comparé. Cette expérience a mis en lumière une dérégulation de 528 gènes dont certains impliqués dans l'organisation des axes embryonnaires et la spécification de l'identité régionale des CCN (gènes *Hox*), dans

le développement des mélanocytes (*Pmel*, *Dct*, *Mitf*), dans l'identité gliale particulièrement de cellules de Schwann (*Mpz*, *Ncam1*, *Egr2* ; mais pas de dérégulation de *Plp1*, *S100 β* ou *Fabp7*). Enfin, l'inférence des réseaux de régulation transcriptionnelle à partir de ces données suggère que NR2F1 pourrait agir en modulant l'expression de gènes en aval de SOX10.

L'ensemble de ces informations ne font que souligner la nécessité de réaliser des expériences complémentaires pour comprendre à partir de quel mécanisme NR2F1 régule des gènes impliqués dans la gliogenèse entérique. Une première approche consisterait à identifier ses interacteurs protéiques. Cela pourrait être réalisé par co-immunoprecipitation (co-IP) à partir de cellules SOX10+ triées d'intestin embryonnaires à différents stades développementaux, suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (LC-MS/MS - chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem). Les interacteurs ainsi identifiés pourraient être validés par co-IP suivie d'un western-blot (ou "pull down blot"). La co-IP permet d'identifier des interacteurs forts, mais elle peut manquer les interactions faibles et transitoires. À l'inverse, la technique BioID, bien que plus complexe à appliquer sur des cellules primaires, offre une meilleure sensibilité pour ces interactions. Des analyses bio-informatiques complémentaires, permettraient ensuite de cartographier les réseaux d'interactions protéiques associés. Par ailleurs, afin d'identifier les réseaux de régulation génétiques de NR2F1, une expérience de Cut&Run pourrait être réalisée pour déterminer les séquences génomiques avec lesquelles NR2F1 interagit aux étapes clés du développement. Ces expériences constituerait une opportunité unique pour mieux comprendre le rôle de NR2F1 dans la gliogenèse entérique.

CONCLUSION

Pour conclure, cette thèse avait pour objectif général de mieux comprendre la diversification des CGE. Tout d'abord, elle a donné lieu à une revue consacrée à la diversité, plasticité et multipotence des CGE, puis à deux articles expérimentaux.

Le premier article décrit en quoi la diversification des CGE en sous-types topo-morphologiques est influencée par des facteurs spatio-temporels et la source de précurseurs lors de la période postnatale. Il démontre notamment pour la première fois, la contribution des PCS à la diversification gliale normale, dont la participation à la neurogenèse était déjà connue. Cet article pose les bases concernant la diversité topo-morphologique gliale normale, et consiste en un point de repère pertinent pour les études suivantes identifiant des altérations gliales éventuelles dans d'autres contextes pathologiques.

Le second article se base sur la première étude, en réalisant une analyse similaire chez un modèle murin de HSCR, les *Nr2f1^{Spt/Spt}*. Il fait suite à deux précédentes publications du laboratoire Pilon, caractérisant respectivement les impacts phénotypiques de la surexpression de *Nr2f1* dans ce modèle et les altérations développementales des PCS et des mélanocytes. Notre étude se place dans la continuité de la caractérisation de la gliogenèse prématurée chez les *Nr2f1^{Spt/Spt}*, et apporte des éléments nouveaux en décrivant une diversification gliale anormale dans une portion intestinale ganglionnaire, comprenant une altération de la contribution des PCS et l'apparition d'une population neuro-glia. Cependant, cet article ne décrit qu'une partie des conséquences postnatales de l'altération de la colonisation des CCN dans ce modèle murin, ce qui nécessite des investigations supplémentaires.

Ainsi, cette thèse s'inscrit dans un contexte dans lequel l'étude des CGE et de la gliogenèse entérique est devenue plus propice dans un champ de recherche qui a longtemps été centré sur les neurones. Particulièrement, de telles recherches apportent une ouverture supplémentaire à la compréhension de phénomènes développementaux complexes qui peuvent ensuite être exploités dans le cadre du développement de solutions thérapeutiques.

APPENDICE A

HARNESSING THE POWER OF ENTERIC GLIAL CELLS' PLASTICITY AND MULTIPOTENCY FOR ADVANCING REGENERATIVE MEDICINE



Review

Harnessing the Power of Enteric Glial Cells' Plasticity and Multipotency for Advancing Regenerative Medicine

Marie A. Lefèvre ^{1,2} , Rodolphe Soret ^{1,2,*} and Nicolas Pilon ^{1,2,3,*}

¹ Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal (UQAM), Montréal, QC H3C 3P8, Canada; lefeuvre.marie@courrier.uqam.ca

² Centre D'excellence en Recherche Sur Les Maladies Orphelines—Fondation Courtois (CERMO-PC), Université du Québec à Montréal, Montréal, QC H2X 3V7, Canada

³ Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1C5, Canada

* Correspondence: soret.rodolphe@uqam.ca (R.S.); pilon.nicolas@uqam.ca (N.P.)

Abstract: The enteric nervous system (ENS), known as the intrinsic nervous system of the gastrointestinal tract, is composed of a diverse array of neuronal and glial cell subtypes. Fascinating questions surrounding the generation of cellular diversity in the ENS have captivated ENS biologists for a considerable time, particularly with recent advancements in cell type-specific transcriptomics at both population and single-cell levels. However, the current focus of research in this field is predominantly restricted to the study of enteric neuron subtypes, while the investigation of enteric glia subtypes significantly lags behind. Despite this, enteric glial cells (EGCs) are increasingly recognized as equally important regulators of numerous bowel functions. Moreover, a subset of postnatal EGCs exhibits remarkable plasticity and multipotency, distinguishing them as critical entities in the context of advancing regenerative medicine. In this review, we aim to provide an updated overview of the current knowledge on this subject, while also identifying key questions that necessitate future exploration.

Keywords: neural crest cells; Schwann cells; enteric glial cells; diversity; plasticity; multipotency; regenerative medicine; Hirschsprung disease; inflammatory bowel diseases



Citation: Lefèvre, M.A.; Soret, R.; Pilon, N. Harnessing the Power of Enteric Glial Cells' Plasticity and Multipotency for Advancing Regenerative Medicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 12475. <https://doi.org/10.3390/ijms241512475>

Academic Editor: Roberto De Giorgio

Received: 20 June 2023

Revised: 31 July 2023

Accepted: 3 August 2023

Published: 5 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The enteric nervous system (ENS) is the most complex division of the peripheral nervous system [1,2], being composed of thousands of interconnected ganglia that contain variable numbers of neurons and glia. In mammals, these ganglia are organized into two interconnected networks known as the myenteric plexus and the submucosal plexus. The myenteric plexus is located between the longitudinal and circular muscle layers of the gastrointestinal tract, and is thereby responsible for regulating mixing and peristaltic patterns of contraction and relaxation. From its position under the mucosa, the submucosal plexus instead regulates various epithelial functions, including selective permeability [2,3]. It is also noteworthy that the ENS interacts bilaterally with both the immune system and the microbiota [4–9]. Moreover, while the ENS largely operates independently of the central nervous system, it plays a crucial role in facilitating bidirectional gut-brain communication via extrinsic afferent and efferent nerves of the vagal, spinal/sympathetic and pelvic pathways [10,11].

The diverse range of gastrointestinal functions controlled by the ENS can be partially attributed to the similarly wide variety of enteric neuron subtypes, with more than 20 functional classes identified in mammals [12–14]. For instance, smooth muscle contraction and relaxation are mainly regulated by cholinergic (excitatory) and nitroergic (inhibitory) neuron subtypes, respectively. However, it is also necessary to acknowledge the importance of enteric glial cells (EGCs) in the regulation of several bowel functions [15–17]. A growing body of evidence even suggests that some of the key functions attributed to the ENS are in fact primarily performed by EGCs. In particular, recent studies convincingly demonstrate

APPENDICE B

SUCCESS OF GDNF-BASED TREATMENT OF HIRSCHSPRUNG DISEASE DEPENDS ON NCAM1 SIGNALING AND VARIOUS SUBTYPES OF ENTERIC NEURAL PROGENITORS

Success of GDNF-based treatment of Hirschsprung disease depends on NCAM1 signaling and various subtypes of enteric neural progenitors

Alassane Gary, Rodolphe Soret, Marie A. Lefèvre, Nejia Lassoued, Ann Aspirot,  Christophe Faure,  Nicolas Pilon

doi: <https://doi.org/10.1101/2025.05.23.655388>

This article is a preprint and has not been certified by peer review [what does this mean?].

Abstract

[Full Text](#) [Info/History](#) [Metrics](#)

 [Preview PDF](#)

ABSTRACT

Hirschsprung disease (HSCR) is a deadly congenital disorder where the enteric nervous system (ENS) is absent from the distal bowel. Current surgical treatment is generally life-saving but is often accompanied by long-term bowel problems and comorbidities. As alternative, we are developing a regenerative therapy based on rectal administration of the neurotrophic factor GDNF. We previously showed that administering GDNF enemas to HSCR mice soon after birth suffice to permanently induce a new ENS from tissue-resident neural progenitors. Here, we clarify the underlying mechanism using single-cell transcriptomics, signal transduction inhibitors and cell lineage tracing tools. Notably, we found that the neurogenic effect of GDNF is mediated by NCAM1, rather than by its canonical signaling receptor RET. We also unveiled the existence of multiple differentiation pathways that involve a larger than expected repertoire of tissue-resident neural progenitors, including a surprising one not derived from the usual neural crest.

Competing Interest Statement

RS and NP are co-founders of the biotech company Neurenati Therapeutics, which had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The remaining authors declare no competing interests.

FUNDER INFORMATION DECLARED

Canadian Institutes of Health Research, <https://ror.org/0lgavpb45>, PJT-180290

APPENDICE C

PARTICIPATION À DES CONGRÈS SCIENTIFIQUES

Présentations orales

Marie Lefèvre, Mylène Bourgeois, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. La diversification des cellules gliales entériques est dérégulée chez un modèle de souris du syndrome Waardenburg type IV. Flash talk - Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2024. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre, Zoé Godefroid, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. Enteric glial cell diversification is influenced by spatiotemporal factors and source of neural progenitors in mice. Flash talk - 7th International Symposium on Development of the Enteric Nervous System : the first 1000 Days – Avril 2024. Philadelphia USA.

Présentations par affiche

Marie Lefèvre, Mylène Bourgeois, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. La diversification des cellules gliales entériques est dérégulée chez un modèle de souris du syndrome Waardenburg type IV. Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2024. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre, Zoé Godefroid, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. Enteric glial cell diversification is influenced by spatiotemporal factors and source of neural progenitors in mice. 7th International Symposium on Development of the Enteric Nervous System : the first 1000 Days – Avril 2024. Philadelphia USA.

Marie Lefèvre, Zoé Godefroid, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. La diversification des cellules gliales entérique est influencée par des facteurs spatiotemporels et la source de progéniteurs neuraux chez la souris. Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2023. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre, Zoé Godefroid, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. Analyse de la diversité des cellules gliales entériques en condition saine et dans un modèle de souris pour le syndrome Waardenburg de type IV.

Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2022. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre, Baptiste Charrier, Frédérique Pelletier, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. Analysis of enteric gliogenesis and enteric glial cell diversification in mice. 6th International Symposium on Development of the Enteric Nervous System : the first 1000 Days – Avril 2022. Ferrara, Italie.

Marie Lefèvre, Rodolphe Soret et Nicolas Pilon. Identification de nouveaux régulateurs de la gliogenèse entérique. Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2021. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre et Nicolas Pilon. Élucidation du réseau de régulation génétique contrôlant la gliogenèse du système nerveux entérique. Colloque annuel du CERMO-FC - Novembre 2020. Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada.

Marie Lefèvre et Nicolas Pilon. Elucidating the gene regulatory network underlying gliogenesis in the enteric nervous system. Chemistry and Biochemistry Graduate Research Conference - Novembre 2020. Université Concordia – Montréal, Québec, Canada.

Prix

Concours Le savoir par l'image – 100 CAD - CERMO-FC - Université du Québec à Montréal – Montréal, Québec, Canada

RÉFÉRENCES

- Adameyko, I., Lallemend, F., Aquino, J. B., Pereira, J. A., Topilko, P., Müller, T., Fritz, N., Beljajeva, A., Mochii, M., Liste, I., Usoskin, D., Suter, U., Birchmeier, C. et Ernfors, P. (2009, Oct 16). Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell*, 139(2), 366-379. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.049>
- Ahmadzai, M. M., Seguella, L. et Gulbransen, B. D. (2021, Oct 5). Circuit-specific enteric glia regulate intestinal motor neurocircuits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 118(40). <https://doi.org/10.1073/pnas.2025938118>
- Alhawaj, A. F. (2022). Stem cell-based therapy for hirschsprung disease, do we have the guts to treat? *Gene Therapy*, 29(10-11), 578-587. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00268-4>
- Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S. V., Gewirtz, A. T. et Srinivasan, S. (2012, Oct). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*, 143(4), 1006-1016.e1004. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.034>
- Arima, Y., Miyagawa-Tomita, S., Maeda, K., Asai, R., Seya, D., Minoux, M., Rijli, F. M., Nishiyama, K., Kim, K.-S., Uchijima, Y., Ogawa, H., Kurihara, Y. et Kurihara, H. (2012, 2012/12/11). Preotic neural crest cells contribute to coronary artery smooth muscle involving endothelin signalling. *Nature Communications*, 3(1), 1267. <https://doi.org/10.1038/ncomms2258>
- Aubé, A. C., Cabarrocas, J., Bauer, J., Philippe, D., Aubert, P., Doulay, F., Liblau, R., Galmiche, J. P. et Neunlist, M. (2006, May). Changes in enteric neurone phenotype and intestinal functions in a transgenic mouse model of enteric glia disruption. *Gut*, 55(5), 630-637. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.067595>
- Avila, J. A., Benthal, J. T., Schafer, J. C., Flaherty, D. K. et Southard-Smith, E. M. (2025, 2025/07/21/). Single Cell Profiling in the Sox10Dom Hirschsprung Mouse Implicates Hox genes in Enteric Neuron Trajectory Allocation. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 101590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmh.2025.101590>
- Bach-Ngohou, K., Mahé, M. M., Aubert, P., Abdo, H., Boni, S., Bourreille, A., Denis, M. G., Lardeux, B., Neunlist, M. et Masson, D. (2010, Jul 15). Enteric glia modulate epithelial cell proliferation and differentiation through 15-deoxy-12,14-prostaglandin J2. *J Physiol*, 588(Pt 14), 2533-2544. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.188409>

Baghdadi, M. B., Ayyaz, A., Coquenlorge, S., Chu, B., Kumar, S., Streutker, C., Wrana, J. L. et Kim, T. H. (2022, Jan 6). Enteric glial cell heterogeneity regulates intestinal stem cell niches. *Cell Stem Cell*, 29(1), 86-100.e106. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.10.004>

Baghdadi, M. B. et Kim, T.-H. (2023, 2023/12/01/). The multiple roles of enteric glial cells in intestinal homeostasis and regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 150-151, 43-49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcd.2023.01.005>

Baidoo, N., Sanger, G. J. et Belai, A. (2023, Feb). Effect of old age on the subpopulations of enteric glial cells in human descending colon. *Glia*, 71(2), 305-316. <https://doi.org/10.1002/glia.24272>

Bali, V. et Grubišić, V. (2024). Enteric glia as friends and foes of the intestinal epithelial barrier function. *Front Immunol*, 15, 1394654. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1394654>

Bannerman, P. G., Mirsky, R., Jessen, K. R., Timpl, R. et Duance, V. C. (1986, Dec). Light microscopic immunolocalization of laminin, type IV collagen, nidogen, heparan sulphate proteoglycan and fibronectin in the enteric nervous system of rat and guinea pig. *J Neurocytol*, 15(6), 733-743. <https://doi.org/10.1007/bf01625191>

Bayliss, W. M. et Starling, E. H. (1899, May 11). The movements and innervation of the small intestine. *J Physiol*, 24(2), 99-143. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1899.sp000752>

Belkind-Gerson, J., Graham, H. K., Reynolds, J., Hotta, R., Nagy, N., Cheng, L., Kamionek, M., Shi, H. N., Aherne, C. M. et Goldstein, A. M. (2017, 2017/05/31). Colitis promotes neuronal differentiation of Sox2+ and PLP1+ enteric cells. *Scientific Reports*, 7(1), 2525. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02890-y>

Belkind-Gerson, J., Hotta, R., Nagy, N., Thomas, A. R., Graham, H., Cheng, L., Solorzano, J., Nguyen, D., Kamionek, M., Dietrich, J., Cherayil, B. J. et Goldstein, A. M. (2015, Apr). Colitis induces enteric neurogenesis through a 5-HT4-dependent mechanism. *Inflamm Bowel Dis*, 21(4), 870-878. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000326>

Benthal, J. T., May-Zhang, A. A. et Southard-Smith, E. M. (2024 Nov 4). Meta-atlas of Juvenile and Adult Enteric Neuron scRNA-seq for Dataset Comparisons and Consensus on Transcriptomic Definitions of Enteric Neuron Subtypes. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.10.31.621315>

Bergeron, K. F., Nguyen, C. M., Cardinal, T., Charrier, B., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2016, Nov 1). Upregulation of the Nr2f1-A830082K12Rik gene pair in murine neural crest cells results in a complex phenotype reminiscent of Waardenburg syndrome type 4. *Dis Model Mech*, 9(11), 1283-1293. <https://doi.org/10.1242/dmm.026773>

Bertacchi, M., Parisot, J. et Studer, M. (2019, 2019/02/15/). The pleiotropic transcriptional regulator COUP-TFI plays multiple roles in neural development and disease. *Brain Research*, 1705, 75-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.04.024>

Bertacchi, M., Romano, A. L., Loubat, A., Tran Mau-Them, F., Willems, M., Faivre, L., Khau van Kien, P., Perrin, L., Devillard, F., Sorlin, A., Kuentz, P., Philippe, C., Garde, A., Neri, F., Di Giaimo, R., Oliviero, S., Cappello, S., D'Incerti, L., Frassoni, C. et Studer, M. (2020, Jul 1). NR2F1 regulates regional progenitor dynamics in the mouse neocortex and cortical gyration in BBSOAS patients. *Embo j*, 39(13), e104163.
<https://doi.org/10.15252/embj.2019104163>

Best, K. E., Addor, M. C., Arriola, L., Balku, E., Barisic, I., Bianchi, F., Calzolari, E., Curran, R., Doray, B., Draper, E., Garne, E., Gatt, M., Haeusler, M., Bergman, J., Khoshnood, B., Klungsoyr, K., Martos, C., Materna-Kiryluk, A., Matias Dias, C., McDonnell, B., Mullaney, C., Nelen, V., O'Mahony, M., Queisser-Luft, A., Randrianaivo, H., Rissmann, A., Rounding, C., Sipek, A., Thompson, R., Tucker, D., Wellesley, D., Zymak-Zakutnia, N. et Rankin, J. (2014, Sep). Hirschsprung's disease prevalence in Europe: a register based study. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 100(9), 695-702.
<https://doi.org/10.1002/bdra.23269>

Bhave, S., Arciero, E., Baker, C., Ho, W. L., Guyer, R. A., Hotta, R. et Goldstein, A. M. (2021, Feb). Pan-enteric neuropathy and dysmotility are present in a mouse model of short-segment Hirschsprung disease and may contribute to post-pullthrough morbidity. *J Pediatr Surg*, 56(2), 250-256. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2020.04.002>

Bhave, S., Guyer, R. A., Picard, N., Omer, M., Hotta, R. et Goldstein, A. M. (2022). Ednrb (-/-) mice with hirschsprung disease are missing Gad2-expressing enteric neurons in the ganglionated small intestine. *Front Cell Dev Biol*, 10, 917243.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.917243>

Bitgood, M. J. et McMahon, A. P. (1995, Nov). Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*, 172(1), 126-138. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.0010>

Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P. et Pachnis, V. (2015, Feb). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*, 63(2), 229-241. <https://doi.org/10.1002/glia.22746>

Boesmans, W., Nash, A., Tasnády, K., Yang, W., Stamp, L. A. et Hao, M. M. (2022). Development, Diversity, and Neurogenic Capacity of Enteric Glia. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.775102>

Boesmans, W., Rocha, N. P., Reis, H. J., Holt, M. et Vanden Berghe, P. (2014, Apr 30). The astrocyte marker Aldh1L1 does not reliably label enteric glial cells. *Neurosci Lett*, 566, 102-105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.02.042>

Bolande, R. P. (1997, Jan-Feb). Neurocristopathy: its growth and development in 20 years. *Pediatr Pathol Lab Med*, 17(1), 1-25.

Bondurand, N., Natarajan, D., Barlow, A., Thapar, N. et Pachnis, V. (2006, May). Maintenance of mammalian enteric nervous system progenitors by SOX10 and endothelin 3 signalling. *Development*, 133(10), 2075-2086. <https://doi.org/10.1242/dev.02375>

Bondurand, N., Natarajan, D., Thapar, N., Atkins, C. et Pachnis, V. (2003, Dec). Neuron and glia generating progenitors of the mammalian enteric nervous system isolated from foetal and postnatal gut cultures. *Development*, 130(25), 6387-6400.
<https://doi.org/10.1242/dev.00857>

130/25/6387 [pii]

Bondurand, N., Pingault, V., Goerich, D. E., Lemort, N., Sock, E., Le Caignec, C., Wegner, M. et Goossens, M. (2000, Aug 12). Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet*, 9(13), 1907-1917.
<https://doi.org/10.1093/hmg/9.13.1907>

Bonnamour, G., Charrier, B., Sallis, S., Leduc, E. et Pilon, N. (2022, Sep). NR2F1 regulates a Schwann cell precursor-vs-melanocyte cell fate switch in a mouse model of Waardenburg syndrome type IV. *Pigment Cell Melanoma Res*, 35(5), 506-516.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.13054>

Bonnamour, G., Soret, R. et Pilon, N. (2021, May). Dhh-expressing Schwann cell precursors contribute to skin and cochlear melanocytes, but not to vestibular melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res*, 34(3), 648-654. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12938>

Brandtzaeg, P. (2013, Mar 1). Gate-keeper function of the intestinal epithelium. *Benef Microbes*, 4(1), 67-82. <https://doi.org/10.3920/bm2012.0024>

Breau, M. A., Pietri, T., Eder, O., Blanche, M., Brakebusch, C., Fässler, R., Thiery, J. P. et Dufour, S. (2006, May). Lack of beta1 integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development*, 133(9), 1725-1734.
<https://doi.org/10.1242/dev.02346>

Brehmer, A., Rupprecht, H. et Neuhuber, W. (2010, Feb). Two submucosal nerve plexus in human intestines. *Histochem Cell Biol*, 133(2), 149-161. <https://doi.org/10.1007/s00418-009-0657-2>

Broders-Bondon, F., Paul-Gilloteaux, P., Carlier, C., Radice, G. L. et Dufour, S. (2012, Apr 15). N-cadherin and β1-integrins cooperate during the development of the enteric nervous system. *Dev Biol*, 364(2), 178-191. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.001>

Brokhman, I., Xu, J., Coles, B. L. K., Razavi, R., Engert, S., Lickert, H., Babona-Pilipos, R., Morshead, C. M., Sibley, E., Chen, C. et van der Kooy, D. (2019, Jan 15). Dual embryonic origin of the mammalian enteric nervous system. *Dev Biol*, 445(2), 256-270. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.11.014>

Brown, I. A. M. et Gulbransen, B. D. (2018, Jan 1). The antioxidant glutathione protects against enteric neuron death in situ, but its depletion is protective during colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 314(1), G39-g52. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00165.2017>

Burns, A. J. et Douarin, N. M. (1998, Nov). The sacral neural crest contributes neurons and glia to the post-umbilical gut: spatiotemporal analysis of the development of the enteric

nervous system. *Development*, 125(21), 4335-4347.
<https://doi.org/10.1242/dev.125.21.4335>

Bush, T. G., Savidge, T. C., Freeman, T. C., Cox, H. J., Campbell, E. A., Mucke, L., Johnson, M. H. et Sofroniew, M. V. (1998, Apr 17). Fulminant jejuno-ileitis following ablation of enteric glia in adult transgenic mice. *Cell*, 93(2), 189-201. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81571-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81571-8)

Butler, A., Hoffman, P., Smibert, P., Papalexi, E. et Satija, R. (2018, 2018/05/01). Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nature Biotechnology*, 36(5), 411-420. <https://doi.org/10.1038/nbt.4096>

Cameron, H. L. et Perdue, M. H. (2007, Jan). Muscarinic acetylcholine receptor activation increases transcellular transport of macromolecules across mouse and human intestinal epithelium in vitro. *Neurogastroenterol Motil*, 19(1), 47-56.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2006.00845.x>

Cao, J., Spielmann, M., Qiu, X., Huang, X., Ibrahim, D. M., Hill, A. J., Zhang, F., Mundlos, S., Christiansen, L., Steemers, F. J., Trapnell, C. et Shendure, J. (2019, Feb). The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature*, 566(7745), 496-502.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-0969-x>

Caputi, V., Marsilio, I., Filpa, V., Cerantola, S., Orso, G., Bistocelli, M., Paccagnella, N., De Martin, S., Montopoli, M., Dall'Acqua, S., Crema, F., Di Gangi, I. M., Galuppini, F., Lante, I., Bogianni, S., Rugge, M., Debetto, P., Giaroni, C. et Giron, M. C. (2017, Oct). Antibiotic-induced dysbiosis of the microbiota impairs gut neuromuscular function in juvenile mice. *Br J Pharmacol*, 174(20), 3623-3639. <https://doi.org/10.1111/bph.13965>

Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A. et Severi, C. (2015, Apr-Jun). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol*, 28(2), 203-209.

Chalazonitis, A., D'Autréaux, F., Pham, T. D., Kessler, J. A. et Gershon, M. D. (2011, Feb 1). Bone morphogenetic proteins regulate enteric gliogenesis by modulating ErbB3 signaling. *Dev Biol*, 350(1), 64-79. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.11.017>

Chalazonitis, A. et Kessler, J. A. (2012). Pleiotropic effects of the bone morphogenetic proteins on development of the enteric nervous system. *Developmental Neurobiology*, 72(6), 843-856. <https://doi.org/10.1002/dneu.22002>

Chalazonitis, A., Pham, T. D., Li, Z., Roman, D., Guha, U., Gomes, W., Kan, L., Kessler, J. A. et Gershon, M. D. (2008, Aug 10). Bone morphogenetic protein regulation of enteric neuronal phenotypic diversity: relationship to timing of cell cycle exit. *J Comp Neurol*, 509(5), 474-492. <https://doi.org/10.1002/cne.21770>

Charrier, B. et Pilon, N. (2017). Toward a better understanding of enteric gliogenesis. *Neurogenesis (Austin)*, 4(1), e1293958. <https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1293958>

- Cheng, L. S., Schwartz, D. M., Hotta, R., Graham, H. K. et Goldstein, A. M. (2016, Nov). Bowel dysfunction following pullthrough surgery is associated with an overabundance of nitrergic neurons in Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg*, 51(11), 1834-1838. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.08.001>
- Cheng, X., Voss, U. et Ekblad, E. (2018, Aug 1). Tuft cells: Distribution and connections with nerves and endocrine cells in mouse intestine. *Exp Cell Res*, 369(1), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.05.011>
- Chow, A. K., Grubišić, V. et Gulbransen, B. D. (2021). Enteric Glia Regulate Lymphocyte Activation via Autophagy-Mediated MHC-II Expression. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 12(4), 1215-1237. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2021.06.008>
- Collins, J., Borojevic, R., Verdu, E. F., Huizinga, J. D. et Ratcliffe, E. M. (2014, Jan). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 26(1), 98-107. <https://doi.org/10.1111/nmo.12236>
- Cornet, A., Savidge, T. C., Cabarrocas, J., Deng, W.-L., Colombel, J.-F., Lassmann, H., Desreumaux, P. et Liblau, R. S. (2001). Enterocolitis induced by autoimmune targeting of enteric glial cells: A possible mechanism in Crohn's disease? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13306-13311. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.231474098>
- Cortay, V., Delaunay, D., Patti, D., Gautier, E., Doerflinger, N., Giroud, P., Knoblauch, K., Huissoud, C., Kennedy, H. et Dehay, C. (2020). Radial Migration Dynamics Is Modulated in a Laminar and Area-Specific Manner During Primate Corticogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.588814>
- Cossais, F., Durand, T., Chevalier, J., Boudaud, M., Kermarrec, L., Aubert, P., Neveu, I., Naveilhan, P. et Neunlist, M. (2016, Jun 1). Postnatal development of the myenteric glial network and its modulation by butyrate. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 310(11), G941-951. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00232.2015>
- Cui, J., Michaille, J. J., Jiang, W. et Zile, M. H. (2003, Aug 15). Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev Biol*, 260(2), 496-511. [https://doi.org/10.1016/s0012-1606\(03\)00257-4](https://doi.org/10.1016/s0012-1606(03)00257-4)
- D'Autréaux, F., Morikawa, Y., Cserjesi, P. et Gershon, M. D. (2007, Jun). Hand2 is necessary for terminal differentiation of enteric neurons from crest-derived precursors but not for their migration into the gut or for formation of glia. *Development*, 134(12), 2237-2249. <https://doi.org/10.1242/dev.003814>
- de Vries, P., Soret, R., Suply, E., Helouy, Y. et Neunlist, M. (2010, 2010/08/01). Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), G539-G547. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00092.2010>

Deal, K. K., Rosebrock, J. C., Eeds, A. M., DeKeyser, J. L., Musser, M. A., Ireland, S. J., May-Zhang, A. A., Buehler, D. P. et Southard-Smith, E. M. (2021, Mar). Sox10-cre BAC transgenes reveal temporal restriction of mesenchymal cranial neural crest and identify glandular Sox10 expression. *Dev Biol*, 471, 119-137.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.12.006>

Debbache, J., Parfejevs, V. et Sommer, L. (2018). Cre-driver lines used for genetic fate mapping of neural crest cells in the mouse: An overview. *genesis*, 56(6-7), e23105.
<https://doi.org/10.1002/dvg.23105>

Delvalle, N. M., Fried, D. E., Rivera-Lopez, G., Gaudette, L. et Gulbransen, B. D. (2018). Cholinergic activation of enteric glia is a physiological mechanism that contributes to the regulation of gastrointestinal motility. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 315(4), G473-G483. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00155.2018>

Di Vincenzo, F., Del Gaudio, A., Petito, V., Lopetuso, L. R. et Scaldaferri, F. (2024). Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*, 19(2), 275-293. <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>

Diwakarla, S., Fothergill, L. J., Fakhry, J., Callaghan, B. et Furness, J. B. (2017, Jun). Heterogeneity of enterochromaffin cells within the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*, 29(6). <https://doi.org/10.1111/nmo.13101>

Dogiel, A. S. et Dogiel, V. Über den Bau der Ganglien in den Geflechten des Darmes und der Gallenblase des Menschen und der Säugetiere. Arch Anat Leipzig.

Drokhlyansky, E., Smillie, C. S., Van Wittenberghe, N., Ericsson, M., Griffin, G. K., Eraslan, G., Dionne, D., Cuoco, M. S., Goder-Reiser, M. N., Sharova, T., Kuksenko, O., Aguirre, A. J., Boland, G. M., Graham, D., Rozenblatt-Rosen, O., Xavier, R. J. et Regev, A. (2020, Sep 17). The Human and Mouse Enteric Nervous System at Single-Cell Resolution. *Cell*, 182(6), 1606-1622.e1623. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.003>

Dushane, G. P. (1938). Neural fold derivatives in the amphibia: Pigment cells, spinal ganglia and Rohon-Beard cells. *Journal of Experimental Zoology*, 78(4), 485-503.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jez.1400780407>

Dyachuk, V., Furlan, A., Shahidi, M. K., Giovenco, M., Kaukua, N., Konstantinidou, C., Pachnis, V., Memic, F., Marklund, U., Müller, T., Birchmeier, C., Fried, K., Ernfors, P. et Adameyko, I. (2014). Parasympathetic neurons originate from nerve-associated peripheral glial progenitors. *Science*, 345(6192), 82-87. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1253281>

Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A. et McMahon, A. P. (1993, Dec 31). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, 75(7), 1417-1430.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90627-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90627-3)

- El-Nachef, W. N. et Bronner, M. E. (2020, Jul 13). De novo enteric neurogenesis in post-embryonic zebrafish from Schwann cell precursors rather than resident cell types. *Development*, 147(13). <https://doi.org/10.1242/dev.186619>
- Elfers, K., Sehnert, A. S., Wagner, A., Zwirner, U., Linge, H., Kulik, U., Poehnert, D., Winny, M., Gundert, B., Aselmann, H. et Mazzuoli-Weber, G. (2025). Functional and Structural Investigation of Myenteric Neurons in the Human Colon. *Gastro Hep Advances*, 4(1). <https://doi.org/10.1016/j.gastha.2024.08.016>
- Erickson, A. G., Kameneva, P. et Adameyko, I. (2023, Mar 30). The transcriptional portraits of the neural crest at the individual cell level. *Semin Cell Dev Biol*, 138, 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.02.017>
- Espinosa-Medina, I., Jevans, B., Boismoreau, F., Chettouh, Z., Enomoto, H., Muller, T., Birchmeier, C., Burns, A. J. et Brunet, J. F. (2017, Nov 7). Dual origin of enteric neurons in vagal Schwann cell precursors and the sympathetic neural crest. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(45), 11980-11985. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710308114>
- Espinosa-Medina, I., Outin, E., Picard, C. A., Chettouh, Z., Dymecki, S., Consalez, G. G., Coppola, E. et Brunet, J. F. (2014, Jul 4). Neurodevelopment. Parasympathetic ganglia derive from Schwann cell precursors. *Science*, 345(6192), 87-90. <https://doi.org/10.1126/science.1253286>
- Evans, R. M. et Mangelsdorf, D. J. (2014, Mar 27). Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell*, 157(1), 255-266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.012>
- Faedo, A., Tomassy, G. S., Ruan, Y., Teichmann, H., Krauss, S., Pleasure, S. J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., Studer, M. et Rubenstein, J. L. (2008, Sep). COUP-TFI coordinates cortical patterning, neurogenesis, and laminar fate and modulates MAPK/ERK, AKT, and beta-catenin signaling. *Cereb Cortex*, 18(9), 2117-2131. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm238>
- Faure, C., Chalazonitis, A., Rhéaume, C., Bouchard, G., Sampathkumar, S. G., Yarema, K. J. et Gershon, M. D. (2007). Gangliogenesis in the enteric nervous system: Roles of the polysialylation of the neural cell adhesion molecule and its regulation by bone morphogenetic protein-4. *Developmental Dynamics*, 236(1), 44-59. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20943>
- Fawkner-Corbett, D., Antanaviciute, A., Parikh, K., Jagielowicz, M., Gerós, A. S., Gupta, T., Ashley, N., Khamis, D., Fowler, D., Morrissey, E., Cunningham, C., Johnson, P. R. V., Koohy, H. et Simmons, A. (2021, Feb 4). Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell*, 184(3), 810-826.e823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.016>
- Fletcher, E. L., Clark, M. J. et Furness, J. B. (2002, Jun). Neuronal and glial localization of GABA transporter immunoreactivity in the myenteric plexus. *Cell Tissue Res*, 308(3), 339-346. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0566-3>

- Foong, J. P. (2016). Postnatal Development of the Mouse Enteric Nervous System. *Adv Exp Med Biol*, 891, 135-143. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27592-5_13
- Foong, J. P., Nguyen, T. V., Furness, J. B., Bornstein, J. C. et Young, H. M. (2012, May 15). Myenteric neurons of the mouse small intestine undergo significant electrophysiological and morphological changes during postnatal development. *J Physiol*, 590(10), 2375-2390. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.225938>
- Foong, J. P. P., Hung, L. Y., Poon, S., Savidge, T. C. et Bornstein, J. C. (2020, Nov 1). Early life interaction between the microbiota and the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 319(5), G541-g548. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00288.2020>
- Fu, M., Lui, V. C., Sham, M. H., Pachnis, V. et Tam, P. K. (2004, Aug 30). Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *J Cell Biol*, 166(5), 673-684. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401077>
- Fu, M., Vohra, B. P., Wind, D. et Heuckeroth, R. O. (2006, Nov 1). BMP signaling regulates murine enteric nervous system precursor migration, neurite fasciculation, and patterning via altered Ncam1 polysialic acid addition. *Dev Biol*, 299(1), 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.016>
- Furlan, A. et Adameyko, I. (2018, 2018/12/01/). Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? *Developmental Biology*, 444, S25-S35. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.02.008>
- Furlan, A., Dyachuk, V., Kastriti, M. E., Calvo-Enrique, L., Abdo, H., Hadjab, S., Chontorotzea, T., Akkuratova, N., Usoskin, D., Kamenev, D., Petersen, J., Sunadome, K., Memic, F., Marklund, U., Fried, K., Topilko, P., Lallemand, F., Kharchenko, P. V., Ernfors, P. et Adameyko, I. (2017, Jul 7). Multipotent peripheral glial cells generate neuroendocrine cells of the adrenal medulla. *Science*, 357(6346). <https://doi.org/10.1126/science.aal3753>
- Furness, J. B. (2012, Mar 6). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(5), 286-294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., Callaghan, B. P., Rivera, L. R. et Cho, H. J. (2014). The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol*, 817, 39-71. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_3
- Gabella, G. (1971, 1971-03-01). Glial Cells in the Myenteric Plexus. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 26(3), 244-245. <https://doi.org/10.1515/znb-1971-0313>
- Gabella, G. (1972, Jan). Fine structure of the myenteric plexus in the guinea-pig ileum. *J Anat*, 111(Pt 1), 69-97.
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience*, 6(3), 425-436. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90135-4)

Gabella, G. et Trigg, P. (1984, Feb). Size of neurons and glial cells in the enteric ganglia of mice, guinea-pigs, rabbits and sheep. *J Neurocytol*, 13(1), 49-71.
<https://doi.org/10.1007/bf01148318>

Gary, A., Soret, R., Lefèvre, M. A., Lassoued, N., Aspirot, A., Faure, C. et Pilon, N. (2025). Success of GDNF-based treatment of Hirschsprung disease depends on NCAM1 signaling and various subtypes of enteric neural progenitors. *bioRxiv*, 2025.2005.2023.655388.
<https://doi.org/10.1101/2025.05.23.655388>

George Warren, W., Osborn, M., Yates, A. et O'Sullivan, S. E. (2024, 2024/05/01/). The emerging role of fatty acid binding protein 7 (FABP7) in cancers. *Drug Discovery Today*, 29(5), 103980. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2024.103980>

Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N. et Roberts, D. J. (2005, Jun). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev*, 122(6), 821-833. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.03.003>

Gonzales, J. et Gulbransen, B. D. (2025, Feb). The Physiology of Enteric Glia. *Annu Rev Physiol*, 87(1), 353-380. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022724-105016>

Goriounova, N. A., Heyer, D. B., Wilbers, R., Verhoog, M. B., Giugliano, M., Verbist, C., Obermayer, J., Kerkhofs, A., Smeding, H., Verberne, M., Idema, S., Baayen, J. C., Pieneman, A. W., de Kock, C. P., Klein, M. et Mansvelder, H. D. (2018, Dec 18). Large and fast human pyramidal neurons associate with intelligence. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.41714>

Graham, K. D., López, S. H., Sengupta, R., Shenoy, A., Schneider, S., Wright, C. M., Feldman, M., Furth, E., Valdivieso, F., Lemke, A., Wilkins, B. J., Naji, A., Doolin, E. J., Howard, M. J. et Heuckeroth, R. O. (2020, Jun). Robust, 3-Dimensional Visualization of Human Colon Enteric Nervous System Without Tissue Sectioning. *Gastroenterology*, 158(8), 2221-2235.e2225. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.035>

Green, S. A., Uy, B. R. et Bronner, M. E. (2017, 2017/04/01). Ancient evolutionary origin of vertebrate enteric neurons from trunk-derived neural crest. *Nature*, 544(7648), 88-91. <https://doi.org/10.1038/nature21679>

Gross, E. R., Gershon, M. D., Margolis, K. G., Gertsberg, Z. V., Li, Z. et Cowles, R. A. (2012, Aug). Neuronal serotonin regulates growth of the intestinal mucosa in mice. *Gastroenterology*, 143(2), 408-417.e402. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.05.007>

Grubišić, V., Bali, V., Fried, D. E., Eltzschig, H. K., Robson, S. C., Mazei-Robison, M. S. et Gulbransen, B. D. (2022). Enteric glial adenosine 2B receptor signaling mediates persistent epithelial barrier dysfunction following acute DSS colitis. *Mucosal Immunology*, 15(5), 964-976. <https://doi.org/10.1038/s41385-022-00550-7>

Grubišić, V., McClain, J. L., Fried, D. E., Grants, I., Rajasekhar, P., Csizmadia, E., Ajijola, O. A., Watson, R. E., Poole, D. P., Robson, S. C., Christofi, F. L. et Gulbransen, B. D. (2020).

Enteric Glia Modulate Macrophage Phenotype and Visceral Sensitivity following Inflammation. *Cell Reports*, 32(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108100>

Grubišić, V., Perez-Medina, A. L., Fried, D. E., Sévigny, J., Robson, S. C., Galligan, J. J. et Gulbransen, B. D. (2019, Sep 1). NTPDase1 and -2 are expressed by distinct cellular compartments in the mouse colon and differentially impact colonic physiology and function after DSS colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 317(3), G314-g332. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00104.2019>

Grundmann, D., Markwart, F., Scheller, A., Kirchhoff, F. et Schäfer, K.-H. (2016, 12/01). Phenotype and distribution pattern of nestin-GFP-expressing cells in murine myenteric plexus. *Cell and Tissue Research*, 366. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2476-9>

Gulbransen, B. D. (2014). *Enteric Glia*. Biota Publishing.
<https://books.google.ca/books?id=s9pFBAAAQBAJ>

Gulbransen, B. D., Bains, J. S. et Sharkey, K. A. (2010, May 12). Enteric glia are targets of the sympathetic innervation of the myenteric plexus in the guinea pig distal colon. *J Neurosci*, 30(19), 6801-6809. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0603-10.2010>

Gulbransen, B. D. et Sharkey, K. A. (2012, Nov). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(11), 625-632.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>

Guo, F., Debidda, M., Yang, L., Williams, D. A. et Zheng, Y. (2006, Jul 7). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem*, 281(27), 18652-18659.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M603508200>

Guyer, R. A., Stavely, R., Robertson, K., Bhave, S., Mueller, J. L., Picard, N. M., Hotta, R., Kaltschmidt, J. A. et Goldstein, A. M. (2023, Mar 28). Single-cell multiome sequencing clarifies enteric glial diversity and identifies an intraganglionic population poised for neurogenesis. *Cell Rep*, 42(3), 112194. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112194>

Hackett-Jones, E. J., Landman, K. A., Newgreen, D. F. et Zhang, D. (2011, 2011/10/21/). On the role of differential adhesion in gangliogenesis in the enteric nervous system. *Journal of Theoretical Biology*, 287, 148-159.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.07.013>

Hall, B. K. (2000, Jan-Feb). The neural crest as a fourth germ layer and vertebrates as quadroblastic not triploblastic. *Evol Dev*, 2(1), 3-5. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142x.2000.00032.x>

Hanani, M. et Reichenbach, A. (1994, Oct). Morphology of horseradish peroxidase (HRP)- injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res*, 278(1), 153-160. <https://doi.org/10.1007/bf00305787>

- Hao, M. M., Anderson, R. B., Kobayashi, K., Whitington, P. M. et Young, H. M. (2009, Jan). The migratory behavior of immature enteric neurons. *Dev Neurobiol*, 69(1), 22-35.
<https://doi.org/10.1002/dneu.20683>
- Hao, M. M., Lomax, A. E., McKeown, S. J., Reid, C. A., Young, H. M. et Bornstein, J. C. (2012). Early Development of Electrical Excitability in the Mouse Enteric Nervous System. *The Journal of Neuroscience*, 32(32), 10949-10960.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1426-12.2012>
- Hao, Y., Hao, S., Andersen-Nissen, E., Mauck, W. M., 3rd, Zheng, S., Butler, A., Lee, M. J., Wilk, A. J., Darby, C., Zager, M., Hoffman, P., Stoeckius, M., Papalex, E., Mimitou, E. P., Jain, J., Srivastava, A., Stuart, T., Fleming, L. M., Yeung, B., Rogers, A. J., McElrath, J. M., Blish, C. A., Gottardo, R., Smibert, P. et Satija, R. (2021, Jun 24). Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell*, 184(13), 3573-3587.e3529.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.04.048>
- Hayakawa, Y., Sakitani, K., Konishi, M., Asfaha, S., Niikura, R., Tomita, H., Renz, B. W., Tailor, Y., Macchini, M., Middelhoff, M., Jiang, Z., Tanaka, T., Dubeykovskaya, Z. A., Kim, W., Chen, X., Urbanska, A. M., Nagar, K., Westphalen, C. B., Quante, M., Lin, C. S., Gershon, M. D., Hara, A., Zhao, C. M., Chen, D., Worthley, D. L., Koike, K. et Wang, T. C. (2017, Jan 9). Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. *Cancer Cell*, 31(1), 21-34.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.11.005>
- Hazard, D., Moulzir, M., Delhomme, B., Oheim, M. et Ricard, C. (2025). Imaging the enteric nervous system. *Frontiers in Neuroanatomy*, 19.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2025.1532900>
- Heermann, S., Spittau, B., Zajzon, K., Schwab, M. H. et Kriegstein, K. (2012, Aug 3). Schwann cells migrate along axons in the absence of GDNF signaling. *BMC Neurosci*, 13, 92.
<https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-92>
- Hendershot, T. J., Liu, H., Sarkar, A. A., Giovannucci, D. R., Clouthier, D. E., Abe, M. et Howard, M. J. (2007, Jan). Expression of Hand2 is sufficient for neurogenesis and cell type-specific gene expression in the enteric nervous system. *Dev Dyn*, 236(1), 93-105.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20989>
- Hernández-Ortega, K., Canul-Euan, A. A., Solis-Paredes, J. M., Borboa-Olivares, H., Reyes-Muñoz, E., Estrada-Gutierrez, G. et Camacho-Arroyo, I. (2024). S100B actions on glial and neuronal cells in the developing brain: an overview. *Front Neurosci*, 18, 1425525.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1425525>
- Heuckeroth, R. O. (2018, Mar). Hirschsprung disease - integrating basic science and clinical medicine to improve outcomes. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 15(3), 152-167.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.149>
- Hoff, S., Zeller, F., von Weyhern, C. W., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K. et Rühl, A. (2008, Aug 1). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric

nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *J Comp Neurol*, 509(4), 356-371. <https://doi.org/10.1002/cne.21769>

Huang, S., Song, J., He, C., Cai, X., Yuan, K., Mei, L. et Feng, Y. (2022, Sep). Genetic insights, disease mechanisms, and biological therapeutics for Waardenburg syndrome. *Gene Ther*, 29(9), 479-497. <https://doi.org/10.1038/s41434-021-00240-2>

Huerta, C. T., Ramsey, W. A., Davis, J. K., Saberi, R. A., Gilna, G. P., Parreco, J. P., Sola, J. E., Perez, E. A. et Thorson, C. M. (2023, May). Nationwide outcomes of newborns with rectosigmoid versus long-segment Hirschsprung disease. *J Pediatr Surg*, 58(5), 849-855. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2023.01.001>

Hung, L. Y., Boonma, P., Unterweger, P., Parathan, P., Haag, A., Luna, R. A., Bornstein, J. C., Savidge, T. C. et Foong, J. P. P. (2019). Neonatal Antibiotics Disrupt Motility and Enteric Neural Circuits in Mouse Colon. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 8(2), 298-300.e296. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2019.04.009>

Ibiza, S., García-Cassani, B., Ribeiro, H., Carvalho, T., Almeida, L., Marques, R., Misic, A. M., Bartow-Mckenney, C., Larson, D. M., Pavan, W. J., Eberl, G., Grice, E. A. et Veiga-Fernandes, H. (2016). Glial-cell-derived neuroregulators control type 3 innate lymphoid cells and gut defence. *Nature*, 535(7612), 440-443. <https://doi.org/10.1038/nature18644>

Jacobson, A., Yang, D., Vella, M. et Chiu, I. M. (2021, May). The intestinal neuro-immune axis: crosstalk between neurons, immune cells, and microbes. *Mucosal Immunol*, 14(3), 555-565. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00368-1>

Jaegle, M., Ghazvini, M., Mandemakers, W., Piirsoo, M., Driegen, S., Levavasseur, F., Raghoenath, S., Grosveld, F. et Meijer, D. (2003, Jun 1). The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev*, 17(11), 1380-1391. <https://doi.org/10.1101/gad.258203>

Jardé, T., Chan, W. H., Rossello, F. J., Kaur Kahlon, T., Theocharous, M., Kurian Arackal, T., Flores, T., Giraud, M., Richards, E., Chan, E., Kerr, G., Engel, R. M., Prasko, M., Donoghue, J. F., Abe, S. I., Phesse, T. J., Nefzger, C. M., McMurrick, P. J., Powell, D. R., Daly, R. J., Polo, J. M. et Abud, H. E. (2020, Oct 1). Mesenchymal Niche-Derived Neuregulin-1 Drives Intestinal Stem Cell Proliferation and Regeneration of Damaged Epithelium. *Cell Stem Cell*, 27(4), 646-662.e647. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.06.021>

Jeong, J., Mao, J., Tenzen, T., Kottmann, A. H. et McMahon, A. P. (2004, Apr 15). Hedgehog signaling in the neural crest cells regulates the patterning and growth of facial primordia. *Genes Dev*, 18(8), 937-951. <https://doi.org/10.1101/gad.1190304>

Jessen, K. R. et Mirsky, R. (1980, Aug 14). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286(5774), 736-737. <https://doi.org/10.1038/286736a0>

- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (1983, Nov). Astrocyte-like glia in the peripheral nervous system: an immunohistochemical study of enteric glia. *J Neurosci*, 3(11), 2206-2218.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.03-11-02206.1983>
- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (2019). Schwann Cell Precursors; Multipotent Glial Cells in Embryonic Nerves. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00069>
- Jiang, X., Rowitch, D. H., Soriano, P., McMahon, A. P. et Sucov, H. M. (2000, Apr). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development*, 127(8), 1607-1616.
<https://doi.org/10.1242/dev.127.8.1607>
- Jiang, Y., Liu, M. T. et Gershon, M. D. (2003, Jun 15). Netrins and DCC in the guidance of migrating neural crest-derived cells in the developing bowel and pancreas. *Dev Biol*, 258(2), 364-384.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12798294
- Joly, A., Leulier, F. et De Vadder, F. (2021). Microbial Modulation of the Development and Physiology of the Enteric Nervous System. *Trends in Microbiology*, 29(8), 686-699.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.11.007>
- Joseph, N. M., He, S., Quintana, E., Kim, Y. G., Núñez, G. et Morrison, S. J. (2011, Sep). Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest*, 121(9), 3398-3411. <https://doi.org/10.1172/jci58186>
- Joseph, N. M., Mukouyama, Y. S., Mosher, J. T., Jaegle, M., Crone, S. A., Dormand, E. L., Lee, K. F., Meijer, D., Anderson, D. J. et Morrison, S. J. (2004, Nov). Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development*, 131(22), 5599-5612.
<https://doi.org/10.1242/dev.01429>
- Kabouridis, P. S. et Pachnis, V. (2015). Emerging roles of gut microbiota and the immune system in the development of the enteric nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 125(3), 956-964. <https://doi.org/10.1172/jci76308>
- Kapitza, C., Chunder, R., Scheller, A., Given, K. S., Macklin, W. B., Enders, M., Kuerten, S., Neuhuber, W. L. et Wörl, J. (2021, Mar 22). Murine Esophagus Expresses Glial-Derived Central Nervous System Antigens. *Int J Mol Sci*, 22(6).
<https://doi.org/10.3390/ijms22063233>
- Kapur, R. P. (1999, Nov-Dec). Early death of neural crest cells is responsible for total enteric aganglionosis in Sox10(Dom)/Sox10(Dom) mouse embryos. *Pediatr Dev Pathol*, 2(6), 559-569. <https://doi.org/10.1007/s100249900162>
- Kapur, R. P., Yost, C. et Palmiter, R. D. (1992, Sep). A transgenic model for studying development of the enteric nervous system in normal and aganglionic mice. *Development*, 116(1), 167-175. <https://doi.org/10.1242/dev.116.Supplement.167>

Kastriti, M. E. et Adameyko, I. (2017, 2017/12/01/). Specification, plasticity and evolutionary origin of peripheral glial cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, 196-202.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.11.004>

Kastriti, M. E., Kameneva, P., Kamenev, D., Dyachuk, V., Furlan, A., Hampl, M., Memic, F., Marklund, U., Lallemand, F., Hadjab, S., Calvo-Enrique, L., Ernfors, P., Fried, K. et Adameyko, I. (2019). Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci*, 12, 6. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00006>

Kastschenko, N. (1888). Zur Entwicklungsgeschichte des selachierembryos. *Anat Anz*, 3, 445-467.

Kaukua, N., Shahidi, M. K., Konstantinidou, C., Dyachuk, V., Kaucka, M., Furlan, A., An, Z., Wang, L., Hultman, I., Ahrlund-Richter, L., Blom, H., Brismar, H., Lopes, N. A., Pachnis, V., Suter, U., Clevers, H., Thesleff, I., Sharpe, P., Ernfors, P., Fried, K. et Adameyko, I. (2014, Sep 25). Glial origin of mesenchymal stem cells in a tooth model system. *Nature*, 513(7519), 551-554. <https://doi.org/10.1038/nature13536>

Kawabata, E., Ohba, N., Nakamura, A., Izumo, S. et Osame, M. (1987, Nov). Waardenburg syndrome: a variant with neurological involvement. *Ophthalmic Paediatr Genet*, 8(3), 165-170. <https://doi.org/10.3109/13816818709031463>

Keirstead, H. S., Ben-Hur, T., Rogister, B., O'Leary, M. T., Dubois-Dalcq, M. et Blakemore, W. F. (1999). Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule-Positive CNS Precursors Generate Both Oligodendrocytes and Schwann Cells to Remyelinate the CNS after Transplantation. *The Journal of Neuroscience*, 19(17), 7529-7536.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-17-07529.1999>

Kendig, D. M., Hurst, N. R. et Grider, J. R. (2016, Jan 27). Spatiotemporal Mapping of Motility in Ex Vivo Preparations of the Intestines. *J Vis Exp*(107), e53263.
<https://doi.org/10.3791/53263>

Khan, A. A., Langston, H. C., Walsh, L., Roscoe, R., Jayawardhana, S., Francisco, A. F., Taylor, M. C., McCann, C. J., Kelly, J. M. et Lewis, M. D. (2024, 2024/05/23). Enteric nervous system regeneration and functional cure of experimental digestive Chagas disease with trypanocidal chemotherapy. *Nature Communications*, 15(1), 4400.
<https://doi.org/10.1038/s41467-024-48749-5>

Kim, J., Lee, Y., Lu, X., Song, B., Fong, K. W., Cao, Q., Licht, J. D., Zhao, J. C. et Yu, J. (2018, Dec 4). Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Rep*, 25(10), 2808-2820.e2804.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.035>

Kim, J., Lo, L., Dormand, E. et Anderson, D. J. (2003, Apr 10). SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells. *Neuron*, 38(1), 17-31.
[https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00163-6)

Kovler, M. L., Gonzalez Salazar, A. J., Fulton, W. B., Lu, P., Yamaguchi, Y., Zhou, Q., Sampah, M., Ishiyama, A., Prindle, T., Jr., Wang, S., Jia, H., Wipf, P., Sodhi, C. P. et Hackam, D. J. (2021, Sep 22). Toll-like receptor 4-mediated enteric glia loss is critical for the development of necrotizing enterocolitis. *Sci Transl Med*, 13(612), eabg3459. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abg3459>

Kuil, L. E., Kakialatou, N. J. M., Windster, J. D., Bindels, E., Zink, J. T. M., van der Zee, G., Hofstra, R. M. W., Shepherd, I. T., Melotte, V. et Alves, M. M. (2023, Jul 21). Unbiased characterization of the larval zebrafish enteric nervous system at a single cell transcriptomic level. *iScience*, 26(7), 107070. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107070>

Laddach, A., Chng, S. H., Lasrado, R., Progatzky, F., Shapiro, M., Erickson, A., Sampedro Castaneda, M., Artemov, A. V., Bon-Frauches, A. C., Amaniti, E.-M., Kleinjung, J., Boeing, S., Ultanir, S., Adameyko, I. et Pachnis, V. (2023). A branching model of lineage differentiation underpinning the neurogenic potential of enteric glia. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41492-3>

Lai, F. P., Li, Z., Zhou, T., Leung, A. O. W., Lau, S. T., Lui, K. N., Wong, W. Y., Sham, P. C., Hui, C. C. et Ngan, E. S. (2021, Oct 15). Ciliary protein Kif7 regulates Gli and Ezh2 for initiating the neuronal differentiation of enteric neural crest cells during development. *Sci Adv*, 7(42), eabf7472. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abf7472>

Lake, J. I. et Heuckeroth, R. O. (2013, Jul 1). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 305(1), G1-24. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2012>

Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P. et Pachnis, V. (2011, Sep). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest*, 121(9), 3412-3424. <https://doi.org/10.1172/jci58200>

Lasrado, R., Boesmans, W., Kleinjung, J., Pin, C., Bell, D., Bhaw, L., McCallum, S., Zong, H., Luo, L., Clevers, H., Vanden Berghe, P. et Pachnis, V. (2017, May 19). Lineage-dependent spatial and functional organization of the mammalian enteric nervous system. *Science*, 356(6339), 722-726. <https://doi.org/10.1126/science.aam7511>

Le Berre-Scoul, C., Chevalier, J., Oleynikova, E., Cossais, F., Talon, S., Neunlist, M. et Boudin, H. (2017, Jan 15). A novel enteric neuron-glia coculture system reveals the role of glia in neuronal development. *J Physiol*, 595(2), 583-598. <https://doi.org/10.1113/jp271989>

Le Douarin, N. M. et Teillet, M. A. (1973, Aug). The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo. *J Embryol Exp Morphol*, 30(1), 31-48.

Lee, S. H., Kwon, J. E. et Cho, M. L. (2018, Jan). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intest Res*, 16(1), 26-42. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.1.26>

Lefèvre, M. A., Godefroid, Z., Soret, R. et Pilon, N. (2024). Enteric glial cell diversification is influenced by spatiotemporal factors and source of neural progenitors in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 18. <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1392703>

Lefevre, M. A., Soret, R. et Pilon, N. (2023, Aug 5). Harnessing the Power of Enteric Glial Cells' Plasticity and Multipotency for Advancing Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*, 24(15). <https://doi.org/10.3390/ijms241512475>

Li, Z. et Ngan, E. S. (2022). New insights empowered by single-cell sequencing: From neural crest to enteric nervous system. *Comput Struct Biotechnol J*, 20, 2464-2472. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.05.025>

Liu, J. A., Lai, F. P., Gui, H. S., Sham, M. H., Tam, P. K., Garcia-Barcelo, M. M., Hui, C. C. et Ngan, E. S. (2015, Dec). Identification of GLI Mutations in Patients With Hirschsprung Disease That Disrupt Enteric Nervous System Development in Mice. *Gastroenterology*, 149(7), 1837-1848.e1835. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.07.060>

Liu, M. T., Kuan, Y. H., Wang, J., Hen, R. et Gershon, M. D. (2009, Aug 5). 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci*, 29(31), 9683-9699. <https://doi.org/29/31/9683> [pii]

10.1523/JNEUROSCI.1145-09.2009

Liu, P., Cheng, H., Roberts, T. M. et Zhao, J. J. (2009, Aug). Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8(8), 627-644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>

Liu, Y. A., Chung, Y. C., Pan, S. T., Shen, M. Y., Hou, Y. C., Peng, S. J., Pasricha, P. J. et Tang, S. C. (2013, May). 3-D imaging, illustration, and quantitation of enteric glial network in transparent human colon mucosa. *Neurogastroenterol Motil*, 25(5), e324-338. <https://doi.org/10.1111/nmo.12115>

López, S. H., Avetisyan, M., Wright, C. M., Mesbah, K., Kelly, R. G., Moon, A. M. et Heuckeroth, R. O. (2018, Dec 1). Loss of Tbx3 in murine neural crest reduces enteric glia and causes cleft palate, but does not influence heart development or bowel transit. *Dev Biol*, 444 Suppl 1(Suppl 1), S337-s351. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.09.017>

Lopez-Anido, C., Sun, G., Koenning, M., Srinivasan, R., Hung, H. A., Emery, B., Keles, S. et Svaren, J. (2015). Differential Sox10 genomic occupancy in myelinating glia. *Glia*, 63(11), 1897-1914. <https://doi.org/10.1002/glia.22855>

Lueschow, S. R. et McElroy, S. J. (2020). The Paneth Cell: The Curator and Defender of the Immature Small Intestine. *Front Immunol*, 11, 587. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00587>

Lyonnet, S., Bolino, A., Pelet, A., Abel, L., Nihoul-Fékété, C., Briard, M. L., Mok-Siu, V., Kaariainen, H., Martucciello, G., Lerone, M., Puliti, A., Luo, Y., Weissenbach, J., Devoto, M., Munnich, A. et Romeo, G. (1993, Aug). A gene for Hirschsprung disease

maps to the proximal long arm of chromosome 10. *Nat Genet*, 4(4), 346-350.
<https://doi.org/10.1038/ng0893-346>

Mahe, M. M., Brown, N. E., Poling, H. M. et Helmrath, M. A. (2017). In Vivo Model of Small Intestine. *Methods Mol Biol*, 1597, 229-245. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_17

Mahmoudi, A., Rami, M., Khattala, K., Elmadi, A., Afifi, M. A. et Youssef, B. (2013). Shah-Waardenburg syndrome. *Pan Afr Med J*, 14, 60.
<https://doi.org/10.11604/pamj.2013.14.60.1543>

Majd, H., Cesiulis, A., Samuel, R. M., Richter, M. N., Elder, N., Guyer, R. A., Hao, M. M., Stamp, L. A., Goldstein, A. M. et Fattahi, F. (2024, Feb 5). A call for a unified and multimodal definition of cellular identity in the enteric nervous system. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2024.01.15.575794>

Majd, H., Samuel, R. M., Ramirez, J. T., Kalantari, A., Barber, K., Ghazizadeh, Z., Chemel, A. K., Cesiulis, A., Richter, M. N., Das, S., Keefe, M. G., Wang, J., Shiv, R. K., McCann, C. J., Bhat, S., Khoroshkin, M., Yu, J., Nowakowski, T. J., Goodarzi, H., Thapar, N., Kaltschmidt, J. A. et Fattahi, F. (2022). hPSC-Derived Enteric Ganglioids Model Human ENS Development and Function [Preprint]. *BioRxiv*, 474746.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2022.01.04.474746>

Malatesta, P. et Götz, M. (2013). Radial glia – from boring cables to stem cell stars. *Development*, 140(3), 483-486. <https://doi.org/10.1242/dev.085852>

May-Zhang, A. A., Tycksen, E., Southard-Smith, A. N., Deal, K. K., Benthal, J. T., Buehler, D. P., Adam, M., Simmons, A. J., Monaghan, J. R., Matlock, B. K., Flaherty, D. K., Potter, S. S., Lau, K. S. et Southard-Smith, E. M. (2021, Feb). Combinatorial Transcriptional Profiling of Mouse and Human Enteric Neurons Identifies Shared and Disparate Subtypes In Situ. *Gastroenterology*, 160(3), 755-770.e726.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.032>

McCallum, S., Obata, Y., Fourli, E., Boeing, S., Peddie, C. J., Xu, Q., Horswell, S., Kelsh, R. N., Collinson, L., Wilkinson, D., Pin, C., Pachnis, V. et Heanue, T. A. (2020, Aug 27). Enteric glia as a source of neural progenitors in adult zebrafish. *eLife*, 9.
<https://doi.org/10.7554/eLife.56086>

McClain, J. L., Fried, D. E. et Gulbransen, B. D. (2015, Nov 1). Agonist-evoked Ca(2+) signaling in enteric glia drives neural programs that regulate intestinal motility in mice. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(6), 631-645.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.08.004>

McKeown, S. J., Chow, C. W. et Young, H. M. (2001). Development of the submucous plexus in the large intestine of the mouse. *Cell and Tissue Research*, 303(2), 301-305.
<https://doi.org/10.1007/s004410000303>

McVey Neufeld, K. A., Perez-Burgos, A., Mao, Y. K., Bienenstock, J. et Kunze, W. A. (2015, May). The gut microbiome restores intrinsic and extrinsic nerve function in germ-free mice accompanied by changes in calbindin. *Neurogastroenterol Motil*, 27(5), 627-636. <https://doi.org/10.1111/nmo.12534>

Mead, T. J. et Yutzey, K. E. (2012, Feb). Notch pathway regulation of neural crest cell development in vivo. *Dev Dyn*, 241(2), 376-389. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23717>

Meir, M., Burkard, N., Ungewiß, H., Diefenbacher, M., Flemming, S., Kannapin, F., Germer, C. T., Schweinlin, M., Metzger, M., Waschke, J. et Schlegel, N. (2019, Jun 17). Neurotrophic factor GDNF regulates intestinal barrier function in inflammatory bowel disease. *J Clin Invest*, 129(7), 2824-2840. <https://doi.org/10.1172/jci120261>

Meir, M., Kannapin, F., Diefenbacher, M., Ghoreishi, Y., Kollmann, C., Flemming, S., Germer, C. T., Waschke, J., Leven, P., Schneider, R., Wehner, S., Burkard, N. et Schlegel, N. (2021, Feb 14). Intestinal Epithelial Barrier Maturation by Enteric Glial Cells Is GDNF-Dependent. *Int J Mol Sci*, 22(4). <https://doi.org/10.3390/ijms22041887>

Memic, F., Knoflach, V., Sadler, R., Tegerstedt, G., Sundström, E., Guillemot, F., Pachnis, V. et Marklund, U. (2016, Apr 13). Ascl1 Is Required for the Development of Specific Neuronal Subtypes in the Enteric Nervous System. *J Neurosci*, 36(15), 4339-4350. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0202-16.2016>

Meyer, D. et Birchmeier, C. (1995, Nov 23). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature*, 378(6555), 386-390. <https://doi.org/10.1038/378386a0>

Michel, K., Kuch, B., Dengler, S., Demir, I. E., Zeller, F. et Schemann, M. (2022). How big is the little brain in the gut? Neuronal numbers in the enteric nervous system of mice, Guinea pig, and human. *Neurogastroenterology & Motility*, 34(12). <https://doi.org/10.1111/nmo.14440>

Michetti, F., Clementi, M. E., Di Liddo, R., Valeriani, F., Ria, F., Rende, M., Di Sante, G. et Romano Spica, V. (2023, May 31). The S100B Protein: A Multifaceted Pathogenic Factor More Than a Biomarker. *Int J Mol Sci*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119605>

Miyamoto, Y., Torii, T., Tanoue, A., Kawahara, K., Arai, M., Tsumura, H., Ogata, T., Nagao, M., Terada, N., Yamamoto, M., Takashima, S. et Yamauchi, J. (2017, 2017/04/29/). Neuregulin-1 type III knockout mice exhibit delayed migration of Schwann cell precursors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 486(2), 506-513. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.074>

Mograbi, B., Bocciardi, R., Bourget, I., Busca, R., Rochet, N., Farahi-Far, D., Juhel, T. et Rossi, B. (2001, Nov 30). Glial cell line-derived neurotrophic factor-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt activities exert opposing effects on the ERK pathway: importance for the rescue of neuroectodermic cells. *J Biol Chem*, 276(48), 45307-45319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101220200>

Molofsky, A. V. et Deneen, B. (2015, Aug). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8), 1320-1329. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>

Montalva, L., Cheng, L. S., Kapur, R., Langer, J. C., Berrebi, D., Kyrklund, K., Pakarinen, M., de Blaauw, I., Bonnard, A. et Gosain, A. (2023, Oct 12). Hirschsprung disease. *Nat Rev Dis Primers*, 9(1), 54. <https://doi.org/10.1038/s41572-023-00465-y>

Moore, S. W. (2012, Nov). Chromosomal and related Mendelian syndromes associated with Hirschsprung's disease. *Pediatr Surg Int*, 28(11), 1045-1058. <https://doi.org/10.1007/s00383-012-3175-6>

Morarach, K., Mikhailova, A., Knoflach, V., Memic, F., Kumar, R., Li, W., Ernfors, P. et Marklund, U. (2021, 2021/01/01). Diversification of molecularly defined myenteric neuron classes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, 24(1), 34-46. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00736-x>

Mueller, J. L. et Goldstein, A. M. (2022, Apr). The science of Hirschsprung disease: What we know and where we are headed. *Semin Pediatr Surg*, 31(2), 151157. <https://doi.org/10.1016/j.sempedsurg.2022.151157>

Mueller, J. L., Leavitt, A. R., Rahman, A. A., Han, C. Y., Ott, L. C., Mahdavian, N. S., Carbone, S. E., King, S. K., Burns, A. J., Poole, D. P., Hotta, R., Goldstein, A. M. et Stavely, R. (2024). Highly neurogenic glia from human and mouse myenteric ganglia generate functional neurons following culture and transplantation into the gut. *Cell Reports*, 43(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114919>

Mueller, J. L., Stavely, R., Guyer, R. A., Soos, A., Bhave, S., Han, C., Hotta, R., Nagy, N. et Goldstein, A. M. (2024, Feb 22). Agrin Inhibition in Enteric Neural Stem Cells Enhances Their Migration Following Colonic Transplantation. *Stem Cells Transl Med*. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szae013>

Mundell, N. A., Plank, J. L., LeGrone, A. W., Frist, A. Y., Zhu, L., Shin, M. K., Southard-Smith, E. M. et Labosky, P. A. (2012, Mar 15). Enteric nervous system specific deletion of Foxd3 disrupts glial cell differentiation and activates compensatory enteric progenitors. *Dev Biol*, 363(2), 373-387. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.003>

Munnes, M., Patrone, G., Schmitz, B., Romeo, G. et Doerfler, W. (1998, Nov 19). A 5'-CG-3'-rich region in the promoter of the transcriptionally frequently silenced RET protooncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene*, 17(20), 2573-2583. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202165>

Musser, M. A., Correa, H. et Southard-Smith, E. M. (2015, Jan 1). Enteric neuron imbalance and proximal dysmotility in ganglionated intestine of the Sox10(Dom^{+/}) Hirschsprung mouse model. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 1(1), 87-101. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2014.08.002>

Nagahama, M., Semb, R., Tsuzuki, M. et Aoki, E. (2001, Sep-Oct). L-arginine immunoreactive enteric glial cells in the enteric nervous system of rat ileum. *Biol Signals Recept*, 10(5), 336-340. <https://doi.org/10.1159/000046901>

Nagy, N., Barad, C., Graham, H. K., Hotta, R., Cheng, L. S., Fejszak, N. et Goldstein, A. M. (2016, Jan 15). Sonic hedgehog controls enteric nervous system development by patterning the extracellular matrix. *Development*, 143(2), 264-275. <https://doi.org/10.1242/dev.128132>

Nagy, N. et Goldstein, A. M. (2006, May 1). Endothelin-3 regulates neural crest cell proliferation and differentiation in the hindgut enteric nervous system. *Dev Biol*, 293(1), 203-217. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.01.032>

Nagy, N. et Goldstein, A. M. (2017, Jun). Enteric nervous system development: A crest cell's journey from neural tube to colon. *Semin Cell Dev Biol*, 66, 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2017.01.006>

Naka, H., Nakamura, S., Shimazaki, T. et Okano, H. (2008, Sep). Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nat Neurosci*, 11(9), 1014-1023. <https://doi.org/10.1038/nn.2168>

Nakazawa, N., Miyahara, K., Okawada, M., Yamataka, A., Suzuki, R., Akazawa, C., Tomikawa-Ichikawa, N. et Arikawa-Hirasawa, E. (2013, Nov). Laminin-1 promotes enteric nervous system development in mouse embryo. *Pediatr Surg Int*, 29(11), 1205-1208. <https://doi.org/10.1007/s00383-013-3388-3>

Neo, W. H., Yap, K., Lee, S. H., Looi, L. S., Khandelia, P., Neo, S. X., Makeyev, E. V. et Su, I. H. (2014, Jul 25). MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. *J Biol Chem*, 289(30), 20788-20801. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525493>

Neunlist, M., Aubert, P., Bonnaud, S., Van Landeghem, L., Coron, E., Wedel, T., Naveilhan, P., Ruhl, A., Lardeux, B., Savidge, T., Paris, F. et Galmiche, J. P. (2007). Enteric glia inhibit intestinal epithelial cell proliferation partly through a TGF- β 1-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(1), G231-G241. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00276.2005>

Neunlist, M. et Schemann, M. (2014). Nutrient-induced changes in the phenotype and function of the enteric nervous system. *The Journal of Physiology*, 592(14), 2959-2965. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.272948>

Neunlist, M., Van Landeghem, L., Mahé, M. M., Derkinderen, P., des Varannes, S. B. et Rollin-Derkinderen, M. (2013, Feb). The digestive neuronal-glial-epithelial unit: a new actor in gut health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 10(2), 90-100. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.221>

Newgreen, D. F., Dufour, S., Howard, M. J. et Landman, K. A. (2013, Oct 1). Simple rules for a "simple" nervous system? Molecular and biomathematical approaches to enteric nervous

system formation and malformation. *Dev Biol*, 382(1), 305-319.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.06.029>

Ngan, E. S., Garcia-Barceló, M. M., Yip, B. H., Poon, H. C., Lau, S. T., Kwok, C. K., Sat, E., Sham, M. H., Wong, K. K., Wainwright, B. J., Cherny, S. S., Hui, C. C., Sham, P. C., Lui, V. C. et Tam, P. K. (2011, Sep). Hedgehog/Notch-induced premature gliogenesis represents a new disease mechanism for Hirschsprung disease in mice and humans. *J Clin Invest*, 121(9), 3467-3478. <https://doi.org/10.1172/jci43737>

Nguyen, T. T., Baumann, P., Tüscher, O., Schick, S. et Endres, K. (2023). *The Aging Enteric Nervous System International Journal of Molecular Sciences* (vol. 24).

Niederreither, K., Vermot, J., Le Roux, I., Schuhbaur, B., Chambon, P. et Dollé, P. (2003, Jun). The regional pattern of retinoic acid synthesis by RALDH2 is essential for the development of posterior pharyngeal arches and the enteric nervous system. *Development*, 130(11), 2525-2534. <https://doi.org/10.1242/dev.00463>

Nishino, J., Saunders, T. L., Sagane, K. et Morrison, S. J. (2010, Nov 10). Lgi4 promotes the proliferation and differentiation of glial lineage cells throughout the developing peripheral nervous system. *J Neurosci*, 30(45), 15228-15240.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2286-10.2010>

Nishiyama, C., Uesaka, T., Manabe, T., Yonekura, Y., Nagasawa, T., Newgreen, D. F., Young, H. M. et Enomoto, H. (2012, Sep). Trans-mesenteric neural crest cells are the principal source of the colonic enteric nervous system. *Nat Neurosci*, 15(9), 1211-1218.
<https://doi.org/10.1038/nn.3184>

Niu, X., Liu, L., Wang, T., Chuan, X., Yu, Q., Du, M., Gu, Y. et Wang, L. (2020). Mapping of Extrinsic Innervation of the Gastrointestinal Tract in the Mouse Embryo. *The Journal of Neuroscience*, 40(35), 6691-6708. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0309-20.2020>

Ochoa-Cortes, F., Turco, F., Linan-Rico, A., Soghomonyan, S., Whitaker, E., Wehner, S., Cuomo, R. et Christofi, F. L. (2016). Enteric Glial Cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, 22(2), 433-449. <https://doi.org/10.1097/mib.0000000000000667>

Odenwald, M. A. et Turner, J. R. (2017, Jan). The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(1), 9-21.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.169>

Okamura, Y. et Saga, Y. (2008, Nov). Notch signaling is required for the maintenance of enteric neural crest progenitors. *Development*, 135(21), 3555-3565.
<https://doi.org/10.1242/dev.022319>

Otani, T. et Furuse, M. (2020, Oct). Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol*, 30(10), 805-817. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.08.004>

Overman, E. L., Rivier, J. E. et Moeser, A. J. (2012). CRF Induces Intestinal Epithelial Barrier Injury via the Release of Mast Cell Proteases and TNF- α . *PLoS ONE*, 7(6), e39935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039935>

Pakarinen, M. P. et Mutanen, A. (2024). Long-term outcomes and quality of life in patients with Hirschsprung disease. *World J Pediatr Surg*, 7(3), e000859. <https://doi.org/10.1136/wjps-2024-000859>

Pan, W., Rahman, A. A., Stavely, R., Bhave, S., Guyer, R., Omer, M., Picard, N., Goldstein, A. M. et Hotta, R. (2022). Schwann Cells in the Aganglionic Colon of Hirschsprung Disease Can Generate Neurons for Regenerative Therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 11(12), 1232-1244. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac076>

Parathan, P., Wang, Y., Leembruggen, A. J. L., Bornstein, J. C. et Foong, J. P. P. (2020, 2020/02/01/). The enteric nervous system undergoes significant chemical and synaptic maturation during adolescence in mice. *Developmental Biology*, 458(1), 75-87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.10.011>

Paratore, C., Eichenberger, C., Suter, U. et Sommer, L. (2002, Nov 15). Sox10 haploinsufficiency affects maintenance of progenitor cells in a mouse model of Hirschsprung disease. *Hum Mol Genet*, 11(24), 3075-3085. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.24.3075>

Paratore, C., Goerich, D. E., Suter, U., Wegner, M. et Sommer, L. (2001, Oct). Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling. *Development*, 128(20), 3949-3961. <https://doi.org/10.1242/dev.128.20.3949>

Parmantier, E., Lynn, B., Lawson, D., Turmaine, M., Namini, S. S., Chakrabarti, L., McMahon, A. P., Jessen, K. R. et Mirsky, R. (1999). Schwann Cell-Derived Desert Hedgehog Controls the Development of Peripheral Nerve Sheaths. *Neuron*, 23(4), 713-724. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)80030-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)80030-1)

Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C. et Brunet, J. F. (1999, May 27). The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*, 399(6734), 366-370. <https://doi.org/10.1038/20700>

Patyal, P., Fil, D. et Wight, P. A. (2023). Plp1 in the enteric nervous system is preferentially expressed during early postnatal development in mouse as DM20, whose expression appears reliant on an intronic enhancer. *Front Cell Neurosci*, 17, 1175614. <https://doi.org/10.3389/fncel.2023.1175614>

Pelaseyed, T., Bergström, J. H., Gustafsson, J. K., Ermund, A., Birchenough, G. M., Schütte, A., van der Post, S., Svensson, F., Rodríguez-Piñeiro, A. M., Nyström, E. E., Wising, C., Johansson, M. E. et Hansson, G. C. (2014, Jul). The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev*, 260(1), 8-20. <https://doi.org/10.1111/imr.12182>

Perlin, J. R., Lush, M. E., Stephens, W. Z., Piotrowski, T. et Talbot, W. S. (2011). Neuronal Neuropilin 1 type III directs Schwann cell migration. *Development*, 138(21), 4639-4648. <https://doi.org/10.1242/dev.068072>

Pham, T. D., Gershon, M. D. et Rothman, T. P. (1991, Dec 22). Time of origin of neurons in the murine enteric nervous system: sequence in relation to phenotype. *J Comp Neurol*, 314(4), 789-798. <https://doi.org/10.1002/cne.903140411>

Pilon, N. (2016). Pigmentation-based insertional mutagenesis is a simple and potent screening approach for identifying neurocristopathy-associated genes in mice. *Rare Diseases*, 4(1), e1156287. <https://doi.org/10.1080/21675511.2016.1156287>

Pilon, N. (2021, May). Treatment and Prevention of Neurocristopathies. *Trends Mol Med*, 27(5), 451-468. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.01.009>

Pingault, V., Ente, D., Dastot-Le Moal, F., Goossens, M., Marlin, S. et Bondurand, N. (2010, Apr). Review and update of mutations causing Waardenburg syndrome. *Hum Mutat*, 31(4), 391-406. <https://doi.org/10.1002/humu.21211>

Platt, J. B. (1897). *The Development of the Cartilaginous Skull and of the Branchial and Hypoglossal Musculature in Necturus*. W. Engelmann.
<https://books.google.ca/books?id=PkJrfgQC>

Populin, L., Stebbing, M. J. et Furness, J. B. (2021). Neuronal regulation of the gut immune system and neuromodulation for treating inflammatory bowel disease. *FASEB BioAdvances*, 3(11), 953-966. <https://doi.org/10.1096/fba.2021-00070>

Prochera, A., Muppirala, A. N., Kuziel, G. A., Soualhi, S., Shepherd, A., Sun, L., Issac, B., Rosenberg, H. J., Karim, F., Perez, K., Smith, K. H., Archibald, T. H., Rakoff-Nahoum, S., Hagen, S. J. et Rao, M. (2025, 2025/04/14). Enteric glia regulate Paneth cell secretion and intestinal microbial ecology. *Elife*, 13, RP97144. <https://doi.org/10.7554/elife.97144>

Progatzky, F. et Pachnis, V. (2022, Aug). The role of enteric glia in intestinal immunity. *Curr Opin Immunol*, 77, 102183. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.102183>

Progatzky, F., Shapiro, M., Chng, S. H., Garcia-Cassani, B., Classon, C. H., Sevgi, S., Laddach, A., Bon-Frauches, A. C., Lasrado, R., Rahim, M., Amaniti, E. M., Boeing, S., Shah, K., Entwistle, L. J., Suarez-Bonnet, A., Wilson, M. S., Stockinger, B. et Pachnis, V. (2021, Nov). Regulation of intestinal immunity and tissue repair by enteric glia. *Nature*, 599(7883), 125-130. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04006-z>

Raghavan, S., Gilmont, R. R. et Bitar, K. N. (2013). Neuroglial differentiation of adult enteric neuronal progenitor cells as a function of extracellular matrix composition. *Biomaterials*, 34(28), 6649-6658. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.023>

Ramalho-Santos, M., Melton, D. A. et McMahon, A. P. (2000, Jun). Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development*, 127(12), 2763-2772. <https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2763>

Rao, M. et Gershon, M. D. (2018). Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? *Nature Reviews Neuroscience*, 19(9), 552-565. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0041-0>

Rao, M., Nelms, B. D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M. D. et Corfas, G. (2015, Jun 29). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.22876>

Rao, M., Rastelli, D., Dong, L., Chiu, S., Setlik, W., Gershon, M. D. et Corfas, G. (2017, Oct). Enteric Glia Regulate Gastrointestinal Motility but Are Not Required for Maintenance of the Epithelium in Mice. *Gastroenterology*, 153(4), 1068-1081 e1067. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.07.002>

Read, A. P. et Newton, V. E. (1997, Aug). Waardenburg syndrome. *J Med Genet*, 34(8), 656-665. <https://doi.org/10.1136/jmg.34.8.656>

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G. R. et Birchmeier, C. (1997, Oct 16). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*, 389(6652), 725-730. <https://doi.org/10.1038/39593>

Rintala, R. J. et Pakarinen, M. P. (2012, Nov). Long-term outcomes of Hirschsprung's disease. *Semin Pediatr Surg*, 21(4), 336-343. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2012.07.008>

Roberts, R. R., Bornstein, J. C., Bergner, A. J. et Young, H. M. (2008, Apr). Disturbances of colonic motility in mouse models of Hirschsprung's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294(4), G996-g1008. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00558.2007>

Roberts, R. R., Ellis, M., Gwynne, R. M., Bergner, A. J., Lewis, M. D., Beckett, E. A., Bornstein, J. C. et Young, H. M. (2010, Apr 1). The first intestinal motility patterns in fetal mice are not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal. *J Physiol*, 588(Pt 7), 1153-1169. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.185421>

Roberts, R. R., Murphy, J. F., Young, H. M. et Bornstein, J. C. (2007, Mar). Development of colonic motility in the neonatal mouse-studies using spatiotemporal maps. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292(3), G930-938. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00444.2006>

Rosenberg, H. J. et Rao, M. (2021, 2021/08/20/). Enteric glia in homeostasis and disease: From fundamental biology to human pathology. *iScience*, 24(8), 102863. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102863>

Rothman, T. P., Tennyson, V. M. et Gershon, M. D. (1986, Oct 22). Colonization of the bowel by the precursors of enteric glia: studies of normal and congenitally aganglionic mutant mice. *J Comp Neurol*, 252(4), 493-506. <https://doi.org/10.1002/cne.902520406>

Roulis, M., Kaklamanos, A., Schernthanner, M., Bielecki, P., Zhao, J., Kaffe, E., Frommelt, L. S., Qu, R., Knapp, M. S., Henriques, A., Chalkidi, N., Koliaraki, V., Jiao, J., Brewer, J. R., Bacher, M., Blackburn, H. N., Zhao, X., Breyer, R. M., Aidinis, V., Jain, D., Su, B.,

- Herschman, H. R., Kluger, Y., Kollias, G. et Flavell, R. A. (2020, Apr). Paracrine orchestration of intestinal tumorigenesis by a mesenchymal niche. *Nature*, 580(7804), 524-529. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2166-3>
- Sanders, K. M., Kito, Y., Hwang, S. J. et Ward, S. M. (2016, Sep). Regulation of Gastrointestinal Smooth Muscle Function by Interstitial Cells. *Physiology (Bethesda)*, 31(5), 316-326. <https://doi.org/10.1152/physiol.00006.2016>
- Sauka-Spengler, T. et Bronner-Fraser, M. (2008, Jul). A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), 557-568. <https://doi.org/10.1038/nrm2428>
- Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. et Sofroniew, M. V. (2007, Apr). Enteric glia regulate intestinal barrier function and inflammation via release of S-nitrosoglutathione. *Gastroenterology*, 132(4), 1344-1358. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.01.051>
- Scavuzzo, M. A., Letai, K. C., Maeno-Hikichi, Y., Wulf Lange, W. J., Shah, I. K., Rameshbabu, J. S., Tomar, A., Shick, H. E., Shah, A. K., Xiong, Y., Cohn, E. F., Allan, K. C. et Tesar, P. J. (2023). Enteric glial hub cells coordinate intestinal motility. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://dx.doi.org/10.1101/2023.06.07.544052>
- Scavuzzo, M. A., Letai, K. C., Maeno-Hikichi, Y., Wulf Lange, W. J., Shah, I. K., Rameshbabu, J. S., Tomar, A., Shick, H. E., Shah, A. K., Xiong, Y., Cohn, E. F., Allan, K. C. et Tesar, P. J. (2023 Jun 9). Enteric glial hub cells coordinate intestinal motility. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.06.07.544052>
- Schäfer, K.-H., Hänsgen, A. et Mestres, P. (1999). Morphological changes of the myenteric plexus during early postnatal development of the rat. *The Anatomical Record*, 256(1), 20-28. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0185\(19990901\)256:1<20::aid-ar4>3.0.co;2-8](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0185(19990901)256:1<20::aid-ar4>3.0.co;2-8)
- Schneider, K. M., Blank, N., Alvarez, Y., Thum, K., Lundgren, P., Litichevskiy, L., Sleeman, M., Bahnsen, K., Kim, J., Kardo, S., Patel, S., Dohnalová, L., Uhr, G. T., Descamps, H. C., Kircher, S., McSween, A. M., Ardabili, A. R., Nemec, K. M., Jimenez, M. T., Glotfelty, L. G., Eisenberg, J. D., Furth, E. E., Henao-Mejia, J., Bennett, F. C., Pierik, M. J., Romberg-Camps, M., Mujagic, Z., Prinz, M., Schneider, C. V., Wherry, E. J., Bewtra, M., Heuckeroth, R. O., Levy, M. et Thaiss, C. A. (2023, 2023/06/22/). The enteric nervous system relays psychological stress to intestinal inflammation. *Cell*, 186(13), 2823-2838.e2820. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.001>
- Schneider, L., Schneider, R., Hamza, E. et Wehner, S. (2024). Extracellular matrix substrates differentially influence enteric glial cell homeostasis and immune reactivity. *Front Immunol*, 15, 1401751. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1401751>
- Schneider, S., Wright, C. M. et Heuckeroth, R. O. (2019, Feb 10). Unexpected Roles for the Second Brain: Enteric Nervous System as Master Regulator of Bowel Function. *Annu Rev Physiol*, 81, 235-259. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121515>

Schneider, S. K., Pauli, P., Lautenbacher, S. et Reicherts, P. (2023, Apr 25). Effects of psychosocial stress and performance feedback on pain processing and its correlation with subjective and neuroendocrine parameters. *Scand J Pain*, 23(2), 389-401.
<https://doi.org/10.1515/sjpain-2021-0204>

Seguella, L. et Gulbransen, B. D. (2021, Aug). Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 18(8), 571-587.
<https://doi.org/10.1038/s41575-021-00423-7>

Seguella, L., McClain, J. L., Esposito, G. et Gulbransen, B. D. (2022). Functional Intraregional and Interregional Heterogeneity between Myenteric Glial Cells of the Colon and Duodenum in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 42(46), 8694-8708.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2379-20.2022>

Sender, R., Fuchs, S. et Milo, R. (2016, Aug). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*, 14(8), e1002533.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>

Shah, K. N., Dalal, S. J., Desai, M. P., Sheth, P. N., Joshi, N. C. et Ambani, L. M. (1981, Sep). White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J Pediatr*, 99(3), 432-435.
[https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(81\)80339-3](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(81)80339-3)

Sharkey, K. A. et Mawe, G. M. (2023, Apr 1). The enteric nervous system. *Physiol Rev*, 103(2), 1487-1564. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2022>

Shemonti, A. S., Eisenberg, J. D., Heuckeroth, R. O., Howard, M. J., Pothen, A. et Rajwa, B. (2022). Generative modeling of the enteric nervous system employing point pattern analysis and graph construction. *arXiv preprint arXiv:2210.15044*.

Simkin, J. E., Zhang, D., Rollo, B. N. et Newgreen, D. F. (2013). Retinoic acid upregulates ret and induces chain migration and population expansion in vagal neural crest cells to colonise the embryonic gut. *PLoS ONE*, 8(5), e64077.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064077>

Simões-Costa, M. et Bronner, M. E. (2015, Jan 15). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. *Development*, 142(2), 242-257. <https://doi.org/10.1242/dev.105445>

Singh, S., Shariff, A., Roy, T., Das, T. et Rani, N. (2015, Jun). Development of myenteric plexus in human foetuses: a quantitative study. *Anat Cell Biol*, 48(2), 124-129.
<https://doi.org/10.5115/acb.2015.48.2.124>

Sohal, G. S., Ali, M. M. et Farooqui, F. A. (2002, Dec). A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *Int J Dev Neurosci*, 20(8), 619-626. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(02\)00103-x](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(02)00103-x)

Soldatov, R., Kaucka, M., Kastriti, M. E., Petersen, J., Chontorotzea, T., Englmaier, L., Akkuratova, N., Yang, Y., Häring, M., Dyachuk, V., Bock, C., Farlik, M., Piacentino, M.

L., Boismoreau, F., Hilscher, M. M., Yokota, C., Qian, X., Nilsson, M., Bronner, M. E., Croci, L., Hsiao, W. Y., Guertin, D. A., Brunet, J. F., Consalez, G. G., Ernfors, P., Fried, K., Kharchenko, P. V. et Adameyko, I. (2019, Jun 7). Spatiotemporal structure of cell fate decisions in murine neural crest. *Science*, 364(6444).

<https://doi.org/10.1126/science.aas9536>

Sorensen, L., Humenick, A., Poon, S. S. B., Han, M. N., Mahdavian, N. S., Hamnett, R., Gómez-De-Mariscal, E., Neckel, P. H., Saito, A., Mutunduwe, K., Glennan, C., Haase, R., McQuade, R. M., Foong, J. P. P., Brookes, S. J. H., Kaltschmidt, J. A., Muñoz-Barrutia, A., King, S. K., Veldhuis, N. A., Carbone, S. E., Poole, D. P. et Rajasekhar, P. (2024). *Gut Analysis Toolbox: Automating quantitative analysis of enteric neurons*. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.01.17.576140>

Soret, R., Lassoued, N., Bonnamour, G., Bernas, G., Barbe, A., Pelletier, M., Aichi, M. et Pilon, N. (2021, Dec 5). Genetic Background Influences Severity of Colonic Aganglionosis and Response to GDNF Enemas in the Holstein Mouse Model of Hirschsprung Disease. *Int J Mol Sci*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222313140>

Soret, R., Mennetrey, M., Bergeron, K. F., Dariel, A., Neunlist, M., Grunder, F., Faure, C., Silversides, D. W. et Pilon, N. (2015, Dec). A collagen VI-dependent pathogenic mechanism for Hirschsprung's disease. *J Clin Invest*, 125(12), 4483-4496. <https://doi.org/10.1172/jci83178>

Soret, R., Schneider, S., Bernas, G., Christophers, B., Souchkova, O., Charrier, B., Righini-Grunder, F., Aspirot, A., Landry, M., Kembel, S. W., Faure, C., Heuckeroth, R. O. et Pilon, N. (2020, Nov). Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor Induces Enteric Neurogenesis and Improves Colon Structure and Function in Mouse Models of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*, 159(5), 1824-1838.e1817. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.07.018>

Southard-Smith, E. M., Kos, L. et Pavan, W. J. (1998, Jan). Sox10 mutation disrupts neural crest development in Dom Hirschsprung mouse model. *Nat Genet*, 18(1), 60-64. <https://doi.org/10.1038/ng0198-60>

Sovrea, A. S. et Bosca, A. B. (2013). Astrocytes reassessment - an evolving concept part one: embryology, biology, morphology and reactivity. *J Mol Psychiatry*, 1(1), 18. <https://doi.org/10.1186/2049-9256-1-18>

Srinivas, S., Watanabe, T., Lin, C. S., William, C. M., Tanabe, Y., Jessell, T. M. et Costantini, F. (2001). Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol*, 1, 4. <https://doi.org/10.1186/1471-213x-1-4>

Stakenborg, M., Abdurahiman, S., De Simone, V., Goverse, G., Stakenborg, N., van Baarle, L., Wu, Q., Pirottin, D., Kim, J.-S., Chappell-Maor, L., Pintelon, I., Thys, S., Pollenus, E., Boon, L., Van den Steen, P., Hao, M., Van Ginderachter, J. A., Boeckxstaens, G. E., Timmermans, J.-P., Jung, S., Marichal, T., Ibiza, S. et Matteoli, G. (2022). Enteric glial cells favor accumulation of anti-inflammatory macrophages during the resolution of

muscularis inflammation. *Mucosal Immunology*, 15(6), 1296-1308.
<https://doi.org/10.1038/s41385-022-00563-2>

Stavely, R., Ott, L. C., Rashidi, N., Sakkal, S. et Nurgali, K. (2023, Oct 27). The Oxidative Stress and Nervous Distress Connection in Gastrointestinal Disorders. *Biomolecules*, 13(11).
<https://doi.org/10.3390/biom13111586>

Stuart, T., Butler, A., Hoffman, P., Hafemeister, C., Papalexi, E., Mauck, W. M., 3rd, Hao, Y., Stoeckius, M., Smibert, P. et Satija, R. (2019, Jun 13). Comprehensive Integration of Single-Cell Data. *Cell*, 177(7), 1888-1902.e1821.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.031>

Sukegawa, A., Narita, T., Kameda, T., Saitoh, K., Nohno, T., Iba, H., Yasugi, S. et Fukuda, K. (2000, May). The concentric structure of the developing gut is regulated by Sonic hedgehog derived from endodermal epithelium. *Development*, 127(9), 1971-1980.
<https://doi.org/10.1242/dev.127.9.1971>

Swenson, O., Rheinlander, H. F. et Diamond, I. (1949, Oct 13). Hirschsprung's disease; a new concept of the etiology; operative results in 34 patients. *N Engl J Med*, 241(15), 551-556.
<https://doi.org/10.1056/nejm194910132411501>

Szabó, A. et Mayor, R. (2018). Mechanisms of Neural Crest Migration. *Annual Review of Genetics*, 52(1), 43-63. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031559>

Tabata, H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Front Neurosci*, 9, 114. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>

Takahashi, T. (2013). Interdigestive migrating motor complex -its mechanism and clinical importance. *J Smooth Muscle Res*, 49, 99-111. <https://doi.org/10.1540/jsmr.49.99>

Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B. B., Siddiqui, A., Lao, K. et Surani, M. A. (2009, May). mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods*, 6(5), 377-382.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>

Tassabehji, M., Read, A. P., Newton, V. E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. et Strachan, T. (1992, Feb 13). Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature*, 355(6361), 635-636.
<https://doi.org/10.1038/355635a0>

Taylor, M. K., Yeager, K. et Morrison, S. J. (2007, Jul). Physiological Notch signaling promotes gliogenesis in the developing peripheral and central nervous systems. *Development*, 134(13), 2435-2447. <https://doi.org/10.1242/dev.005520>

Teillet, M. A. et Le Douarin, N. (1974, Jan). [Determination of the level of the origin of the adrenal medulla cells in the neural axis using heterospecific grafts of quail neural rudiments on chick embryos]. *Arch Anat Microsc Morphol Exp*, 63(1), 51-62.
(Détermination par la méthode des greffes hétérospécifiques d'ébauches neurales de caille

sur l'embryon de poulet, du niveau du névraxe dont dérivent les cellules médullo-surréaliennes.)

Tilghman, J. M., Ling, A. Y., Turner, T. N., Sosa, M. X., Krumm, N., Chatterjee, S., Kapoor, A., Coe, B. P., Nguyen, K. H., Gupta, N., Gabriel, S., Eichler, E. E., Berrios, C. et Chakravarti, A. (2019, Apr 11). Molecular Genetic Anatomy and Risk Profile of Hirschsprung's Disease. *N Engl J Med*, 380(15), 1421-1432.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706594>

Torroglosa, A., Villalba-Benito, L., Luzón-Toro, B., Fernández, R. M., Antiñolo, G. et Borrego, S. (2019, Jun 26). Epigenetic Mechanisms in Hirschsprung Disease. *Int J Mol Sci*, 20(13).
<https://doi.org/10.3390/ijms20133123>

Touraine, R. L., Attié-Bitach, T., Manceau, E., Korsch, E., Sarda, P., Pingault, V., Encha-Razavi, F., Pelet, A., Augé, J., Nivelon-Chevallier, A., Holschneider, A. M., Munnes, M., Doerfler, W., Goossens, M., Munnich, A., Vekemans, M. et Lyonnet, S. (2000, May). Neurological phenotype in Waardenburg syndrome type 4 correlates with novel SOX10 truncating mutations and expression in developing brain. *Am J Hum Genet*, 66(5), 1496-1503. <https://doi.org/10.1086/302895>

Touré, A. M., Landry, M., Souchkova, O., Kembel, S. W. et Pilon, N. (2019, 2019/01/24). Gut microbiota-mediated Gene-Environment interaction in the TashT mouse model of Hirschsprung disease. *Scientific Reports*, 9(1), 492. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36967-z>

Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N. J., Livak, K. J., Mikkelsen, T. S. et Rinn, J. L. (2014, 2014/04/01). The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nature Biotechnology*, 32(4), 381-386. <https://doi.org/10.1038/nbt.2859>

Uesaka, T., Nagashimada, M. et Enomoto, H. (2013). GDNF Signaling Levels Control Migration and Neuronal Differentiation of Enteric Ganglion Precursors. *The Journal of Neuroscience*, 33(41), 16372-16382. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2079-13.2013>

Uesaka, T., Nagashimada, M. et Enomoto, H. (2015, Jul 8). Neuronal Differentiation in Schwann Cell Lineage Underlies Postnatal Neurogenesis in the Enteric Nervous System. *J Neurosci*, 35(27), 9879-9888. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1239-15.2015>

Uesaka, T., Okamoto, M., Nagashimada, M., Tsuda, Y., Kihara, M., Kiyonari, H. et Enomoto, H. (2021, Nov). Enhanced enteric neurogenesis by Schwann cell precursors in mouse models of Hirschsprung disease. *Glia*, 69(11), 2575-2590. <https://doi.org/10.1002/glia.24059>

Van Landeghem, L., Chevalier, J., Mahé, M. M., Wedel, T., Urvil, P., Derkinderen, P., Savidge, T. et Neunlist, M. (2011, Jun). Enteric glia promote intestinal mucosal healing via activation of focal adhesion kinase and release of proEGF. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 300(6), G976-987. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00427.2010>

Vanderwinden, J. M., Timmermans, J. P. et Schiffmann, S. N. (2003, May). Glial cells, but not interstitial cells, express P2X7, an ionotropic purinergic receptor, in rat gastrointestinal musculature. *Cell Tissue Res*, 312(2), 149-154. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0716-2>

Vanner, S. et Macnaughton, W. K. (2004, Apr). Submucosal secretomotor and vasodilator reflexes. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 1, 39-43. <https://doi.org/10.1111/j.1743-3150.2004.00473.x>

Vega-Lopez, G. A., Cerrizuela, S., Tribulo, C. et Aybar, M. J. (2018, 2018/12/01).

Neurocristopathies: New insights 150 years after the neural crest discovery. *Developmental Biology*, 444, S110-S143.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.05.013>

Viola, M. F., Chavero-Pieres, M., Modave, E., Delfini, M., Stakenborg, N., Estévez, M. C., Fabre, N., Appeltans, I., Martens, T., Vandereyken, K., Theobald, H., Van Herck, J., Petry, P., Verheijden, S., De Schepper, S., Sifrim, A., Liu, Z., Ginhoux, F., Azhar, M., Schlitzer, A., Matteoli, G., Kierdorf, K., Prinz, M., Vanden Berghe, P., Voet, T. et Boeckxstaens, G. (2023, 2023/06/01). Dedicated macrophages organize and maintain the enteric nervous system. *Nature*, 618(7966), 818-826. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06200-7>

von Boyen, G. B. T., Schulte, N., Pflüger, C., Spaniol, U., Hartmann, C. et Steinkamp, M. (2011, 2011/01/14). Distribution of enteric glia and GDNF during gut inflammation. *BMC Gastroenterology*, 11(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-3>

Waardenburg, P. J. (1951, Sep). A new syndrome combining developmental anomalies of the eyelids, eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and head hair and with congenital deafness. *Am J Hum Genet*, 3(3), 195-253.

Wang, X., Chan, A. K., Sham, M. H., Burns, A. J. et Chan, W. Y. (2011, Sep). Analysis of the sacral neural crest cell contribution to the hindgut enteric nervous system in the mouse embryo. *Gastroenterology*, 141(3), 992-1002.e1001-1006. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.002>

Weikum, E. R., Liu, X. et Ortlund, E. A. (2018, Nov). The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci*, 27(11), 1876-1892. <https://doi.org/10.1002/pro.3496>

Wester, T., O'Briain, D. S. et Puri, P. (1999, May). Notable postnatal alterations in the myenteric plexus of normal human bowel. *Gut*, 44(5), 666-674. <https://doi.org/10.1136/gut.44.5.666>

Wight, P. A. (2017). Effects of Intron 1 Sequences on Human PLP1 Expression: Implications for PLP1 -Related Disorders. *ASN Neuro*, 9(4), 175909141772058. <https://doi.org/10.1177/1759091417720583>

Williams, R., Lendahl, U. et Lardelli, M. (1995, Nov). Complementary and combinatorial patterns of Notch gene family expression during early mouse development. *Mech Dev*, 53(3), 357-368. [https://doi.org/10.1016/0925-4773\(95\)00451-3](https://doi.org/10.1016/0925-4773(95)00451-3)

Windster, J. D., Kakailatu, N. J. M., Kuil, L. E., Antanaviciute, A., Sacchetti, A., Mackenzie, K. C., Peulen-Zink, J., Kan, T. W., Bindels, E., De Pater, E., Doukas, M., Van Den Bosch, T. P. P., Yousefi, S., Barakat, T.-S., Meeussen, C. J. H. M., Sloots, P. C. E. J., Wijnen, R. M. H., Parikh, K., Boesmans, W., Melotte, V., Hofstra, R. M. W., Simmons, A. et Alves, M. M. (2025). Human Enteric Glia Diversity in Health and Disease: New Avenues for the Treatment of Hirschsprung Disease. *Gastroenterology*, 168(5), 965-979.e912.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2024.12.011>

Windster, J. D., Kuil, L. E., Kakailatu, N. J. M., Antanaviciute, A., Sacchetti, A., MacKenzie, K. C., Peulen-Zink, J., Kan, T. W., Bindels, E., de Pater, E., Doukas, M., Yousefi, S., Barakat, T. S., Meeussen, C., Sloots, C. E. J., Wijnen, R. M. H., Parikh, K., Boesmans, W., Melotte, V., Hofstra, R., Simmons, A. et Alves, M. M. (2023). Human enteric glia diversity in health and disease: new avenues for the treatment of Hirschsprung disease. *BioRxiv*, 559481.

Wood, J. D. (2016). Enteric Nervous System: Neuropathic Gastrointestinal Motility. *Digestive Diseases and Sciences*, 61(7), 1803-1816. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4183-5>

Woods, C., Flockton, A. R. et Belkind-Gerson, J. (2024, Mar 13). Phosphatase and Tensin Homolog Inhibition in Proteolipid Protein 1-Expressing Cells Stimulates Neurogenesis and Gliogenesis in the Postnatal Enteric Nervous System. *Biomolecules*, 14(3).
<https://doi.org/10.3390/biom14030346>

Woods, C., Flockton, A. R., Wallace, L. E., Keenan, C. M., Macklin, W. B., Sharkey, K. A. et Belkind-Gerson, J. (2023). Proteolipid protein 1 is involved in the regulation of intestinal motility and barrier function in the mouse. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 324(2), G115-G130.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00171.2022>

Woods, C., Kapur, R. P., Bischoff, A., Lovell, M., Arnold, M., Pena, A., Flockton, A., Sharkey, K. A. et Belkind-Gerson, J. (2021, Jul). Neurons populating the rectal extrinsic nerves in humans express neuronal and Schwann cell markers. *Neurogastroenterol Motil*, 33(7), e14074. <https://doi.org/10.1111/nmo.14074>

Wright, C. M., Schneider, S., Smith-Edwards, K. M., Mafra, F., Leembruggen, A. J. L., Gonzalez, M. V., Kothakapa, D. R., Anderson, J. B., Maguire, B. A., Gao, T., Missall, T. A., Howard, M. J., Bornstein, J. C., Davis, B. M. et Heuckeroth, R. O. (2021). scRNA-Seq Reveals New Enteric Nervous System Roles for GDNF, NRTN, and TBX3. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 11(5), 1548-1592.e1541.
<https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.12.014>

Xie, M., Kamenev, D., Kaucka, M., Kastriti, M. E., Zhou, B., Artemov, A. V., Storer, M., Fried, K., Adameyko, I., Dyachuk, V. et Chagin, A. S. (2019, Jul 23). Schwann cell precursors contribute to skeletal formation during embryonic development in mice and zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(30), 15068-15073.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1900038116>

Yamaguchi, H., Zhou, C., Lin, S.-C., Durand, B., Tsai, S. Y. et Tsai, M.-J. (2004, 2004/02/15/). The nuclear orphan receptor COUP-TFI is important for differentiation of oligodendrocytes. *Developmental Biology*, 266(2), 238-251.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.038>

Yang, W., Pham, J., King, S. K., Newgreen, D. F., Young, H. M., Stamp, L. A. et Hao, M. M. (2022, Aug 10). A Novel Method for Identifying the Transition Zone in Long-Segment Hirschsprung Disease: Investigating the Muscle Unit to Ganglion Ratio. *Biomolecules*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/biom12081101>

Yang, Z. et Wang, K. K. W. (2015, 2015/06/01/). Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in Neurosciences*, 38(6), 364-374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.04.003>

Yntema, C. L. et Hammond, W. S. (1954, Oct). The origin of intrinsic ganglia of trunk viscera from vagal neural crest in the chick embryo. *J Comp Neurol*, 101(2), 515-541.
<https://doi.org/10.1002/cne.901010212>

Yoo, B. B. et Mazmanian, S. K. (2017, Jun 20). The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. *Immunity*, 46(6), 910-926.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>

Young, H. M., Bergner, A. J., Anderson, R. B., Enomoto, H., Milbrandt, J., Newgreen, D. F. et Whitington, P. M. (2004, Jun 15). Dynamics of neural crest-derived cell migration in the embryonic mouse gut. *Dev Biol*, 270(2), 455-473.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.03.015>

Young, H. M., Bergner, A. J. et Müller, T. (2003). Acquisition of neuronal and glial markers by neural crest-derived cells in the mouse intestine. *Journal of Comparative Neurology*, 456(1), 1-11. <https://doi.org/10.1002/cne.10448>

Young, H. M. et Ciampoli, D. (1998, Mar). Transient expression of neuronal nitric oxide synthase by neurons of the submucous plexus of the mouse small intestine. *Cell Tissue Res*, 291(3), 395-401. <https://doi.org/10.1007/s004410051009>

Zaitoun, I., Erickson, C. S., Barlow, A. J., Klein, T. R., Heneghan, A. F., Pierre, J. F., Epstein, M. L. et Gosain, A. (2013, Mar). Altered neuronal density and neurotransmitter expression in the ganglionated region of Ednrb null mice: implications for Hirschsprung's disease. *Neurogastroenterol Motil*, 25(3), e233-244. <https://doi.org/10.1111/nmo.12083>

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L. E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K. D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U. et Linnarsson, S. (2018, Aug 9). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*, 174(4), 999-1014.e1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>

Zhou, B., Feng, C., Sun, S., Chen, X., Zhusun, D., Wang, D., Yu, X., Meng, X., Xiao, J., Wu, L., Wang, J., Wang, J., Chen, K., Li, Z., You, J., Mao, H., Yang, S., Zhang, J., Jiao, C.,

Li, Z., Yu, D., Wu, X., Zhu, T., Yang, J., Xiang, L., Liu, J., Chai, T., Shen, J., Mao, C. X., Hu, J., Hao, X., Xiong, B., Zheng, S., Liu, Z. et Feng, J. (2024, Jul 8). Identification of signaling pathways that specify a subset of migrating enteric neural crest cells at the wavefront in mouse embryos. *Dev Cell*, 59(13), 1689-1706.e1688.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2024.03.034>

Zlotogora, J., Lerer, I., Bar-David, S., Ergaz, Z. et Abeliovich, D. (1995, May). Homozygosity for Waardenburg syndrome. *Am J Hum Genet*, 56(5), 1173-1178.

Zong, H., Espinosa, J. S., Su, H. H., Muzumdar, M. D. et Luo, L. (2005). Mosaic Analysis with Double Markers in Mice. *Cell*, 121(3), 479-492.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.012>